



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 A61K 31/725, C08B 37/08, A61K 45/00 // (A61K 31/725, 31:40)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/59603</p> <p>(43) 国際公開日 1999年11月25日 (25.11.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02600</p> <p>(22) 国際出願日 1999年5月19日 (19.05.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/138329 1998年5月20日 (20.05.98) JP 特願平10/224187 1998年8月7日 (07.08.98) JP 特願平11/43064 1999年2月22日 (22.02.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 田村達也(TAMURA, Tatsuya)[JP/JP] 岡町 晃(OKAMACHI, Akira)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: REMEDIES FOR JOINT DISEASES BOUND TO HYALURONIC ACID</p> <p>(54)発明の名称 関節疾患治療薬とヒアルロン酸との結合体</p> <p>(57) Abstract Remedies for joint diseases bound to hyaluronic acid, its derivatives or salts thereof by which the remedies can be pooled in the joint cavity. Namely, one or more remedies for joint diseases bound to hyaluronic acid, its derivatives or salts thereof; a process for producing the above bound products which comprises binding a remedy for joint disease (for example, a matrix protease inhibitor) at a site not affecting the activity of the drug to a carboxyl group, a hydroxyl group or a functional group at the reducing end of hyaluronic acid, its derivative or a salt thereof either by direct chemical reaction or via a spacer; and drugs containing these bound products.</p>		

# (57)要約

本発明の目的は、関節疾患治療薬を関節腔内に貯留させることのできる、関節疾患治療薬とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体を提供することである。本発明により、1種以上の関節疾患治療薬とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体；関節疾患治療薬（例えば、マトリックスプロテアーゼ阻害剤）中の活性に影響を及ぼさない部位と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩のカルボキシル基、水酸基または還元末端の官能基とを、直接の化学反応によって又はスパーサーを介して結合させることを含む、上記結合体の製造方法；並びに上記結合体を含む医薬が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LU	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BH	バーレーン	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノールウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明 細 書

## 関節疾患治療薬とヒアルロン酸との結合体

技術分野

- 5      本発明は、関節疾患治療薬を結合させたヒアルロン酸又はその誘導体又はそれらの塩に関する。さらに詳細には、本発明は、変形性関節症、慢性関節リウマチ等の治療に有効な、関節疾患治療薬と、ヒアルロン酸又はその誘導体又はそれらの塩とを化学的に結合させた結合体、その製造方法並びに上記結合体を含む医薬に関する。

10

背景技術

- 関節軟骨は約 70 % の水分と、軟骨細胞および軟骨マトリックスとから構成されている。軟骨マトリックスを構成する主成分はコラーゲンとプロテオグリカンであり、網目構造を有するコラーゲンのネットワークに水分保持能に富むプロテ  
15      オグリカンが含有されている。軟骨マトリックスは粘弾性に富み、軟骨にかかる刺激や負荷を軽減して、関節軟骨が正常な形態と機能を保持する上で重要な役割を果たしている。

- 変形性関節症(以下、OAとも称す)と慢性関節リウマチ(以下、RAとも称す)は、共に軟骨マトリックスの破壊を伴う代表的な疾患である。両疾患におけるマ  
20      トリックスの破壊は、OAでは加齢に伴うメカニカルストレス、RAでは滑膜表層細胞の過剰増殖、パニヌス形成、炎症性細胞の浸潤などが引き金となり、いずれもプロテアーゼの誘導を介して惹起されると考えられている。軟骨マトリックスの分解は中性の pH を持つ細胞外で行われることから、この領域の pH を至適とするマトリックスメタロプロテアーゼ(以下、MMPとも称す。総称として用  
25      いる時にはMMPsとも称す)が分解の中心的な担い手と言われている。

現在までに、MMPファミリーに属するものとして、ヒトでは16種類のプロテアーゼが報告されており、それらと結合して活性を阻害する組織メタロプロテアーゼインヒビター(以下、TIMPとも称す。総称として用いる時は、TIMPsとも称す)と呼ばれる生体内タンパク質も4種類が見いだされている。MMP

s は生理的条件下では発生、血管新生、性周期、骨リモデリング、組織修復などさまざまな機能を担っている。これらの機能が適切に発現されるよう、MMP s の産生、活性化および基質との相互作用の各段階はTIMP s 等によって厳密にコントロールされている。換言すれば、病態でのマトリックスの破壊は、MMP s の調節機構に何らかの破綻が生じ、MMP s が過剰に産生、活性化されたことに起因すると考えられる。

それゆえ、MMP s を阻害する薬物は、OA や RA 等の関節疾患における軟骨マトリックスの破壊を抑制する薬物として極めて有望である。MMP s を阻害する薬物はこれまでも数多く報告されているが、阻害活性の強さとMMP s への特異性の高さからヒドロキサム酸であるMMP阻害剤が、現在、最も注目されている。既に経口投与でもMMP阻害作用を発揮するヒドロキサム酸が見いだされており、そのうちのいくつかは癌患者や関節炎患者を対象に、臨床試験が開始されている。

しかし、この種のMMP阻害剤は、程度の差こそあれ、すべてのMMP s に対する阻害作用を持ち、生理的な機能に関わるMMP s をも抑制してしまうという重大な欠点がある。事実、癌患者を対象に進行中のヒドロキサム酸の臨床試験では、一過性ながら骨筋肉痛、腱炎などの副作用が報告されている。最近では、特定のMMP s への特異性を高めた改良品の開発も進められているが、未だ病態のみに関与するMMP s は見いだされていない。また、続々と新規なMMP s が発見されていることから、全身投与時にはMMP s の何らかの生理作用を抑制してしまう可能性が依然として残る。

上記問題点を解消する試みとしては、第1に、ヒドロキサム酸の関節腔内への局所投与が考えられる。しかし、ヒドロキサム酸の局所濃度を維持するためには、頻回の投与が必要となり、長期の投与を余儀なくされるOA や RA の患者では、極めて困難である。他の試みとしては、ヒドロキサム酸を標的部位にのみ限定的に局在させる、いわゆるドラッグデリバリーシステムの使用が考えられる。しかし、従来技術では投与されたヒドロキサム酸を罹患関節内に限定的に局在または貯留させる方法は確立されていない。

このように、ヒドロキサム酸は優れた薬理作用を有しながらも、OA や RA の

ような慢性疾患の治療薬として臨床応用するためには、依然として解決すべき問題点が存在する。

一方、現在、関節疾患、特にOAや肩関節周囲炎においては、ヒアルロン酸（以下、HAとも称す）及びその架橋物（以下、ヒアルロン酸とその架橋物を総称してHA製剤とも称す）の関節内注入療法が臨床的に広く行われている。

ヒアルロン酸（HA）は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸との繰り返し単位より構成される生体内多糖であり、関節液を構成する主成分として関節液の粘弾性、荷重吸収作用および潤滑作用の保持に重要な働きを果たしている。また、HAは、軟骨マトリックスにおいて、軟骨プロテオグリカンと結合して、アグリカンと呼ばれる重合体を形成し、軟骨基質の水分保持能と粘弾性を維持する中心的な役割を担っている。

一般に、HA製剤は、MMPsを阻害する作用はないものの、潤滑剤として、更には関節でのHA産生を促進するなどにより、関節機能の障害を緩和する作用を有すると言われている。HAは元々、細胞外マトリックスの構成成分でもあることから細胞外マトリックスに高い親和性を有し、またそれ自身高い粘弾性を有することから、関節内に注入された後、関節腔内に長時間局在する特徴を有している。実際、<sup>14</sup>C標識HAを用いた実験では、ウサギ膝関節腔内に投与された<sup>14</sup>C標識HAは、関節液、滑膜組織、関節軟骨の表層などに分布し、それらの組織から消失するのに3日間以上を要すると報告されている。また、HAは関節液中では分解を受けず、滑膜組織や関節軟骨では一部が分解されるものの、大半は徐々に滑膜を介して血中に移行し、肝臓にて低分子化を受けると言われている。

従って、HA製剤に何らかの薬物を結合させた後、生体内に投与すれば、その薬物はHA製剤と共に特定部位に長時間貯留し、薬物単独を投与した場合に比べ、特定部位での薬物の作用時間は、大幅に延長することが期待される。また、こうした効果により、薬物の投与量、投与回数は従来の投与方法に比べ著しく低減でき、結果的に副作用を大幅に軽減させることが可能となることが期待される。

HAと薬物との結合体としては、これまでに、特開平5-85942号公報記載のインターフェロナーヒアルロン酸結合体、WO92/06714号公報記載のヒアルロン酸-抗癌剤結合物質、特開昭62-64802号公報記載のヒアル

ロン酸－コルチコステロイド結合体、及び特許第2701865号公報記載のヒアルロン酸－抗生物質共役結合体等が知られている。

しかし、これらの例では殆どの場合、HAが低分子化を受けるか、HAと薬物の結合が加水分解を受けるなどして薬物が遊離し、その薬物が標的細胞または組織に取り込まれてはじめて薬効が発現する。

### 発明の開示

本発明の目的の一つは、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤、特にヒドロキサム酸を関節腔内に貯留させることのできるマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤；あるいはその他の非ステロイド抗炎症薬、シクロオキシゲナーゼ-2阻害薬、疾患修飾性抗リウマチ薬またはステロイド薬）とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体を提供することである。

本発明の別の目的は、上記結合体の製造方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的は、上記結合体を含む医薬を提供することである。

本発明者らは、MMP阻害作用を有するヒドロキサム酸が人工的な多糖の一種であるアガロースにカップリングした場合でも、MMPsへの結合能を保持していることを証明した例があること（Moore W. M. & Spilburg C. A., Biochemistry 25, 5189-5195 (1986)）、並びに、これまで発見された全てのMMPsが細胞外あるいは細胞表層で機能を発現する酵素であることに着目し、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤、あるいはその他の非ステロイド抗炎症薬、シクロオキシゲナーゼ-2阻害薬、疾患修飾性抗リウマチ薬またはステロイド薬）をHA又はHA誘導体又はそれらの塩に化学的に結合させることによって作製される結合体、例えばヒドロキサム酸とHA製剤との共有結合体は、両者が結合したままの状態でもMMP阻害作用を発現することを見出し、本発明を完成するに至った。

さらにまた、関節腔内に投与された関節疾患治療薬とHA又はHA誘導体又はそれらの塩との結合物は、HA製剤同様、関節腔内に長期間貯留し、MMP阻害剤に伴う全身性の副作用を軽減すると共に、関節疾患治療薬としてのHAの薬効

を保持しうることを、すなわち、局所において両者相俟った相乗的な薬効が期待でき、生物学的有用性が改善された薬剤となりうることを見だし、本発明を完成するに至った。

- 即ち、本発明の第 1 の側面によれば、(1) 1 種以上の関節疾患治療薬と (2) ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体が提供される。

本発明の一態様では、関節疾患治療薬とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合は共有結合である。

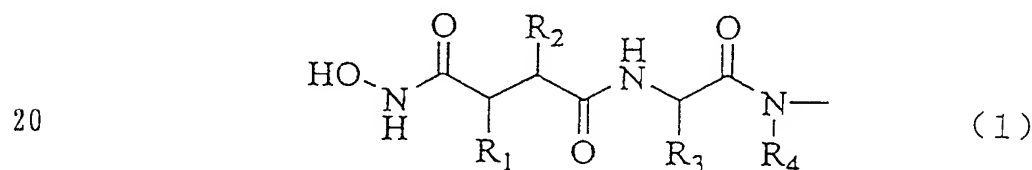
本発明の一態様では、関節疾患治療薬はマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤である。

- 本発明の一態様では、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤はスペーサーを介してヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩と結合している。

本発明の結合体において、結合体全体に対するマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の重量割合には特に制限はないが、好ましくは 0.01 ~ 50 %、特に好ましくは 0.1 ~ 10 % である。

- 本発明の結合体において好ましくは、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤はヒドロキサム酸残基である。

マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤は特に好ましくは、一般式 (1) :

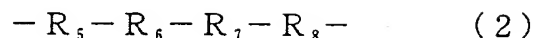


- [式中、 $\text{R}_1$ は、水素原子、水酸基、又は炭素数 1 ~ 8 の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し； $\text{R}_2$ は、炭素数 1 ~ 8 の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し； $\text{R}_3$ は、シクロアルキル基、アリール基もしくは複素環基で置換されていてもよい炭素数 1 ~ 8 の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し； $\text{R}_4$ は、水素原子、又は炭素数 1 ~ 4 の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]

で表されるヒドロキサム酸残基である。

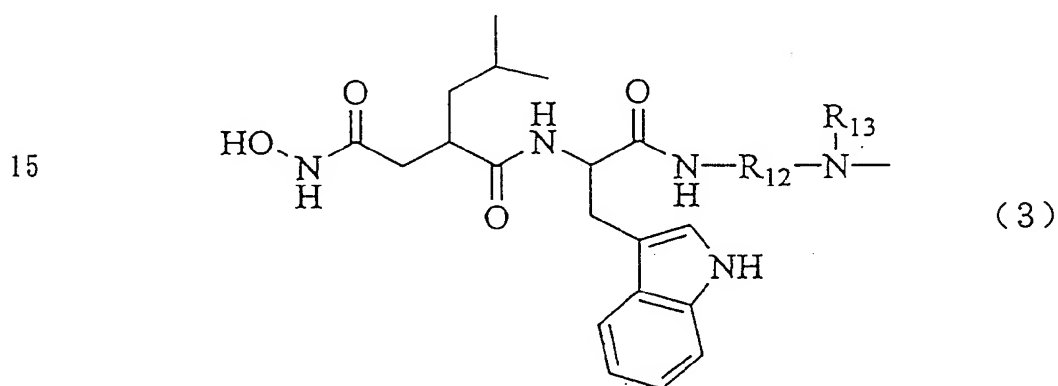
本発明の結合体においては、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤とヒアルロン酸成分との間にスペーサーが存在する場合、スペーサーは特に好ましくは、

一般式 (2) :



[式中、 $R_5$ は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $R_6$ は、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基もしくはイミノ基、または酸素原子を表し； $R_7$ は、1～3個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数1～10の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $R_8$ は、酸素原子、硫黄原子、又は $NR_9$ （ここで、 $R_9$ は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す）を表す。]  
で表される。

10 本発明の結合体において、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤とスペーサーとの結合体の特に好ましい具体例は、一般式 (3) :



20 [式中、 $R_{12}$ は、1個のイミノ基および／又は1～4個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数2～23の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $R_{13}$ は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]  
で表される。

25 また本発明の結合体を生体に投与した場合、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤はヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩と結合した状態でマトリックスメタロプロテアーゼを阻害する。

本発明の第2の側面によれば、関節疾患治療薬中の活性に影響を及ぼさない部位と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩のカルボキシル基、水酸基または還元末端の官能基とを、直接の化学反応によって又はスペーサーを



介して結合させることを含む、本発明の結合体の製造方法が提供される。即ち、上記の製造方法においては、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）中の活性に影響を及ぼさない部位と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩のカルボキシル基、水酸基または還元末端の官能基とを、直接の化学反応によって結合させること、あるいは、結合反応を行う時、  
5 関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）とスパーサーの先端にある反応点との間に空間が生じるため、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）の立体的影響を受けることなくHA又はHA誘導体又はそれらの塩と反応すること、及び／又は、結合体において、HA又はHA誘導体又はそれらの塩と関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）との間に空間が生じるため、MMPがHA又はHA誘導体又はそれらの塩の立体的影響を受けることなく関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）に近づくこと、すなわち、MMP阻害活性が結合した状態でも維持されること等を期待して、スパーサーを介して結合させることが含まれる。

本発明の第3の側面によれば、本発明の結合体を含む医薬が提供される。

15 本発明の医薬は、特には関節疾患の治療薬、さらに具体的には変形性関節症、慢性関節リウマチ又は肩関節周囲炎の治療薬である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の結合体による各種MMPsに対する阻害活性（上の図はコラゲナーゼ1に対する阻害活性、下の図はストロメライシン1に対する阻害活性）を示すグラフである。

図2は、本発明の結合体による各種MMPsに対する阻害活性（上の図はゲラチナーゼAに対する阻害活性、下の図はゲラチナーゼBに対する阻害活性）を示すグラフである。

25 図3は、本発明の結合体によるコラーゲンフィルム破壊阻害活性を示すグラフである。

図4は、本発明の結合体の結合安定性（結合体5の安定性、37℃、生理食塩水中）を示すグラフである。

図5は、本発明の結合体の結合安定性（結合体4の半透膜に対する透過性）を

示すグラフである。

図 6 は、本発明の結合体のラット関節腔貯留性を示すグラフである。

図 7 は、本発明の結合体のラット関節腔貯留性を示すグラフである。

- 5 図 8 は、本発明の結合体による各種 MMP s に対する阻害活性（上の図はコラゲナーゼ 1 に対する阻害活性、下の図はストロメライシン 1 に対する阻害活性）を示すグラフである。

図 9 は、本発明の結合体による各種 MMP s に対する阻害活性（上の図はゲラチナーゼ A に対する阻害活性、下の図はゲラチナーゼ B に対する阻害活性）を示すグラフである。

- 10 図 10 は、本発明の結合体による関節軟骨コラーゲン破壊阻害活性を示すグラフである。図 10 において、\* はインターロイキン-1 + プラスミノゲン添加群と有意差があることを示す（ $p < 0.05$ 、Dunnett の多重比較検定、平均値 ± 標準誤差（ $n = 4$ ））。

#### 15 発明を実施するための好ましい形態

本発明において、関節治療薬としては、例えば；

- (1) サリチル酸系非ステロイド抗炎症薬（サザピリン、アスピリン、ジフルニサル、サリチルアミド等が挙げられる）、フェナム酸系非ステロイド抗炎症薬（フルフェナム酸、フルフェナム酸アルミニウム、メフェナム酸、フロクタフェニン、トルフェナム酸等が挙げられる）、アリール酢酸系非ステロイド抗炎症薬（ジクロフェナクナトリウム、トルメチンナトリウム、スリンダク、フェンブフェン、インドメタシン、インドメタシンファルネシル、アセメタシン、マレイン酸プログルメタシン、アンフェナクナトリウム、ナブメトン、モフェゾラク、エトドラク、アルクロフェナク等が挙げられる）、プロピオン酸系非ステロイド抗炎症薬（イブプロフェン、フルルビプロフェン、ケトプロフェン、ナプロキセン、プラノプロフェン、フェノプロフェンカルシウム、チアプロフェン酸、オキサプロジン、ロキソプロフェンナトリウム、アルミノプロフェン、ザルトプロフェン、チアプロフェン酸等が挙げられる）、ピラゾロン系非ステロイド抗炎症薬（ケトフェニルブタゾン等が挙げられる）、オキシカム系非ステロイド抗炎症薬（ピロ

キシカム、テノキシカム、アンピロキシカム等が挙げられる）、塩基性非ステロイド抗炎症薬（塩酸チアラミド、塩酸チノリジン、塩酸ベンジダミン、エピリゾール、エモルファゾン等が挙げられる）などの非ステロイド抗炎症薬；

（２） シクロオキシゲナーゼ２阻害薬（セレコキシブ（celecoxib）：サール、  
5 MK-966：メルク、JTE522：日本たばこ等が挙げられる）；

（３） ペニシラミン、ロベンザリットニナトリウム、オーラノフィン、ブシラミン、アクタリット、サラゾスルファピリジン、金チオリンゴ酸ナトリウム、クロロキン、TNF  $\alpha$  受容体製剤（例えばEnbrel（登録商標）：アメリカン・ホーム・プロダクツ）、ミゾリビン、シクロスポリン、メトトレキサート、leflunomide：  
10 ヘキスト マリオン ルセル、アザチオプリン、FK-506：藤沢薬品、VX-497：Vertex、TAK-603：武田薬品工業、抗TNF  $\alpha$  抗体（例えばinfliximab：Centocor、D2E7：Knoll）、抗IL-6受容体抗体（例えば、MRA：中外製薬）、T-614：富山化学、KE-298、大正製薬、mycophenolate mofetil：Roche、thalidomide：Celgen、抗CD4抗体、IL-1受容体アンタゴニスト、抗CD52抗体、p38MAPキナーゼ阻害薬、  
15 ICE阻害薬、TACE阻害薬などの抗リウマチ薬；

（４） ステロイド薬（酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、デキサメタゾン、パルミチン酸デキサメタゾン、ベタメタゾン、酢酸パラメタゾン、酢酸ハロプレドン、ファルネシル酸プレドニゾロン、酢酸テトラコサクチド等が  
20 挙げられる）；

（５） 塩酸プロカイン、塩酸テトラカイン、塩酸リドカインなどの局所麻酔薬；  
並びに

（６） マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤などの軟骨保護薬；  
が挙げられるが、好ましくはマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤が挙げられ  
25 る。

本発明において、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）阻害剤とは、任意の生体（好ましくは哺乳類、特に好ましくはヒト）由来の任意のマトリックスメタロプロテアーゼの活性を、例えばそれに結合すること等により、阻害することができる全ての物質を意味する。

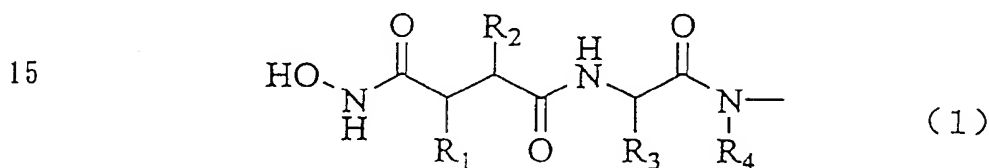
より具体的には、MMP 阻害剤とは、カルボン酸、リン酸、チオール、ヒドロキسام酸等の官能基を介してMMPの活性中心の亜鉛に結合することで酵素阻害活性を発揮する化合物またはタンパク質（ポリペプチドを含む）を意味し、また、MMP s あるいは、分子中にディスインテグリンとMMP様のドメインを併せ持つタンパク分解酵素（例えば、TNF  $\alpha$  変換酵素、あるいはディスインテグリン-メタロプロテアーゼファミリー（ADAM）に属する一群のプロテアーゼ）の酵素活性の発現を阻害するものを意味する。これらのMMP 阻害剤の活性は、例えば、Cawston, T.E. & Barrett, A. J [Anal Biochem., 99, 340-345 (1979)] や Baici, Aら [Anal. Biochem., 108, 230-232 (1980)] に記載された標識基質、Masui, Y ら [Biochem. Med., 17, 215-221 (1977)] に記載された合成基質のMMP s による分解に対する阻害活性として測定することができ、簡便には、これらの方法に基づいて開発された市販のMMP 活性測定キットを用いて同様に測定することもできる。また、コラーゲン等の基質のフィルム上で培養した細胞をサイトカインで刺激した際に産生・活性化されるMMP s の活性を、培養液中への基質分解物の遊離を指標に測定する実験系 [Gavrilovic, Jら: Cell. Biol. Int. Reports, 9, 1097-1107 (1985); Br. J. Pharmacol., 100, 631-635 (1990) 中で引用されている]、あるいは末梢白血球をリポポリサッカリド等で刺激して惹起される細胞膜表層からのTNF  $\alpha$  の遊離をTNF  $\alpha$  変換酵素の活性として評価する実験系 [DiMartino ら: Inflamm. Res., 46, 211-215 (1997)] などにおいて、MMP s やTNF  $\alpha$  変換酵素の産生や活性化に対する阻害活性として測定することもできる。上記のMMP 阻害剤は、これら測定系の少なくとも一つで10 mg/ml以下のいずれかの濃度で50%以上の抑制を示すことを特徴とする。さらに、その構造式中に化学修飾を施しても、これら測定系のいずれか一つにおいて、阻害活性が10 mg/ml以下のいずれかの濃度で45%以上の抑制を示していれば、そのような化学修飾された阻害剤も含まれる。

MMP 阻害剤の非限定的具体例としては、テトラサイクリン系化合物（テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、及びテトラサイクリンの化学修飾体（例えば CMT 1～4；コラゲネックス）等が挙げられる）、TIMPs、及びヒドロキサム酸等が挙げられ、MMP 阻害活性の強さと MMPs への特異性

の高さの点から、好ましくはヒドロキサム酸が挙げられる。

このようなMMP阻害剤の例は、例えば、特公平9-80825号公報、特許第2736285号公報、及びドラッグ・ディスカバリー・トゥデイ、1, 16-26(1996)等に記載されている。

- 5      ヒドロキサム酸とは、N-ヒドロキシアミド基を有する化合物を意味し、非限定的具体例としては、AG-3340（アグロン（Agouron））、CDP-845（ゼネカ）、CGS-27023A（ノバルティス）、D5410（カイロサイエンス）、L758354（メルク）、CH-138（カイロサイエンス）、マリマスタット（Marimastat、登録商標、ブリティッシュバイオテック）、ガラルディン（Galardin、登録商標、グリコメッド）、Ro31-9790（ロシュ）、Ro32-3555（ロシュ）、BAY12-9566（バイアー）及びRS130830（ロッシュバイオサイエンス）等が挙げられる。また本発明の結合体中のヒドロキサム酸残基の非限定的具体例としては、例えば一般式（1）：



- 20      [式中、 $R_1$ は、水素原子、水酸基、又は炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し； $R_2$ は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し； $R_3$ は、シクロアルキル基、アリール基もしくは複素環基で置換されていてもよい炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し； $R_4$ は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]

で示されるヒドロキサム酸残基が挙げられる。

- 25      一般式（1）で示されるMMP阻害剤であるヒドロキサム酸残基の定義において、 $R_1$ の非限定的具体例としては、水素原子、水酸基、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチル基、t-ブチル基、n-ペンチル基、n-ヘキシル基、n-ヘプチル基、n-オクチル基等が挙げられるが、好ましくは水素原子である。

$R_2$ の非限定的具体例としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、i-ブ

ロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、*n*-ヘプチル基、*n*-オクチル基等が挙げられるが、好ましくはイソブチル基である。

- 5  $R_3$ における、シクロアルキル基、アリール基もしくは複素環基で置換されていてもよい炭素数1~8の直鎖もしくは分岐鎖状アルキル基の炭素数1~8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基中のアルキル基成分の非限定的具体例としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基、*n*-ヘプチル基、*n*-オクチル基等が挙げられるが、好ましくは、メチル基、イ  
10 ソブチル基、*t*-ブチル基である。

また、上記アルキル基上に存在していてもよいシクロアルキル基、アリール基もしくは複素環基の非限定的具体例としては；

炭素数3~10、好ましくは炭素数5~7のシクロアルキル基（例えば、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、又はシクロヘプチル基等）；

- 15 水酸基、メトキシ基等の置換基を有していてもよい炭素数6~20、好ましくは炭素数6~14のアリール基（例えば、フェニル基、*p*-ヒドロキシフェニル基、又はナフチル基等）；並びに

- 窒素原子、硫黄原子又は酸素原子の中から選択される同一又は異なる1個以上、好ましくは1から3個、特に好ましくは1個のヘテロ原子を含む、原子数5~2  
20 0、好ましくは原子数5~10、特に好ましくは原子数5、6、9又は10の飽和又は不飽和の複素環（例えば、ピリジル基、キノリル基、又は3-インドリル基等；特に好ましくは3-インドリル基）が挙げられる。

- 代表的には、 $R_3$ は、アリール基もしくは複素環基で置換されている炭素数1~5の直鎖状のアルキル基が好ましく、なかでもベンジル基、*p*-ヒドロキシベン  
25 ジル基、3-インドリルメチル基が特に好ましく、3-インドリルメチル基が最も好ましい。

$R_4$ の非限定的具体例としては、水素原子、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*t*-ブチル基が挙げられるが、好ましくは水素原子である。

一般式（１）で示されるヒドロキサム酸残基は１個以上の不斉炭素中心を含むが、各不斉炭素中心について、その絶対配置がR配置及びS配置のいずれのものも、本発明に含まれる。

マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の重量割合は、結合体全体に対して好ましくは0.01～50%であり、特に好ましくは0.1～10%である。

なお、本発明の１種以上の関節疾患治療薬とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体において、好ましい関節疾患治療薬であるMMP阻害剤は、結合体の合成過程もしくは合成後で、その構造が変化する場合があり得るが、変化した場合でも、本明細書に記載した阻害活性（MMP阻害、コラーゲン分解抑制、およびTNF $\alpha$ の遊離抑制のいずれか１つ以上）を有していれば、本発明に含まれる。

本発明において、「ヒアルロン酸（HA）」とは、重量平均分子量100,000～10,000,000を有する、グルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとから成る二糖の重合体、並びにこれらの混合物を意味する。ヒアルロン酸は、粘弾性の強さの点から、重量平均分子量700,000～10,000,000を有するヒアルロン酸が好ましく、重量平均分子量1,000,000～10,000,000のヒアルロン酸が特に好ましい。

本発明において「ヒアルロン酸誘導体」とは、ヒアルロン酸から誘導されるヒアルロン酸骨格を有する全ての物質を意味する。ヒアルロン酸誘導体の非限定的具体例としては；

（１） 糖成分であるグルクロン酸及び／又はN-アセチルグルコサミンが還元末端を有しているヒアルロン酸誘導体；

（２） ヒアルロン酸中の１以上の水酸基がアセチル化されているアセチル化ヒアルロン酸；

（３） 重量平均分子量100,000～10,000,000を有するグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンとからなる二糖の重合体を、ホルムアルデヒドで架橋してさらに高分子化した誘導体（例えば、シンビスク（Synvisc、登録商標、バイオマトリックス）；並びに

（４） 本明細書中上記したヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体に１以上の薬

効成分、例えば制癌剤（例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アルカロイド等が挙げられる）、免疫抑制剤、抗炎症剤（ステロイド剤、非ステロイド系抗炎症剤等が挙げられる）、抗リウマチ剤、抗菌剤（ $\beta$ -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、マクロライド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、新キノロン系抗生物質、ポリペプチド系抗生物質、サルファ剤等が挙げられる）などを、スペーサーを介して又は介さずに結合させることによって得られる誘導体：

等が挙げられる。

ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体の塩の非限定的具体例としては、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、アルミニウム塩などを挙げることができる。

HAの由来には特に制限はないが、例えば、放線菌等のバクテリア、ヒト、ブタ、ニワトリ等に由来するHAを使用できる。

HA及びそれらの塩の非限定的具体例としては、例えば、スベニール（登録商標、日本ルセル）、アルツ（登録商標、科研製薬）、オペガン（登録商標、参天製薬）、ヒアルガン（登録商標、フィーディア）、オルトビスク（登録商標、アニカセラピューティックス）、ヒアロン（登録商標、ファルマシア&アップジョン）等を挙げることでき、また、和光純薬工業（株）等の各種試薬メーカーのカタログに記載のHA及びこれらの塩を挙げることでもある。

本発明の結合体においては、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩とは、スペーサーを介して又は介さずに結合している。関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との間の結合様式としては、スペーサーを介さない場合にはアミド結合、エーテル結合等の結合が挙げられ、あるいはスペーサーを介して結合している。好ましくは、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩とは、スペーサーを介して結合している。

関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）とヒアル



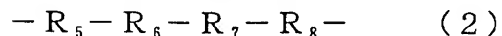
ロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩とがスペーサーを介さずに結合している場合、これらの両者はそれらの活性を損なわない部位で結合している。また、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩とがスペーサーを介して結合している本発明の好ましい態様においては、スペーサーと関節疾患治療薬、並びにスペーサーとHA又はHA誘導体又はそれらの塩は、関節疾患治療薬及びHA又はHA誘導体又はそれらの塩が、その活性を損なわない部位でスペーサーと、それぞれ結合している。

そのような活性を損なわない部位としては、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）においては、例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、及びチオール基等が挙げられる。また、MMP阻害剤である関節疾患治療薬が一般式（1）で表されるヒドロキサム酸残基である本発明の好ましい態様の場合、その末端に位置する1級もしくは2級のアミノ基が挙げられる。HA又はHA誘導体又はそれらの塩においては、例えば、水酸基又はカルボキシル基が挙げられるが、好ましくはカルボキシル基である。

関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）とHA又はHA誘導体又はそれらの塩、スペーサーと関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）、並びにスペーサーとHA又はHA誘導体又はそれらの塩との間の結合の種類は特に限定されないが、例えば、アミド結合、エーテル結合、エステル結合、スルフィド結合が挙げられる。

HA又はHA誘導体又はそれらの塩に結合する関節疾患治療薬は1種である必要はなく、2種以上の異なる関節疾患治療薬であってもよい。また、1つの結合体にスペーサーを介した結合部位とスペーサーを介さない結合部位とを有することを妨げない。さらには、1つの結合体中に存在するスペーサーが同一である必要もない。

スペーサーの種類は、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）とHA又はHA誘導体又はそれらの塩の活性に重大な影響を及ぼさない限り特に限定されず、その非限定的具体例としては、例えば一般式（2）：



[式中、 $R_5$ は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $R_6$ は、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基もしくはイミノ基、または酸素原子を表し； $R_7$ は、1～3個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数1～10の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $R_8$ は、酸素原子、硫黄原子、又は $NR_9$ （ここで、 $R_9$ は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す）を表す。]で示されるスペーサーが挙げられる。

上記一般式(2)で示されるスペーサーは、 $R_5$ -末端で関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）と結合し、 $R_8$ -末端でHA又はHA誘導体又はそれらの塩と結合する。

一般式(2)で示されるスペーサーの定義において、 $R_5$ の非限定的具体例としては、メチレン基、エタン-1，2-ジイル基、プロパン-1，3-ジイル基、ブタン-1，4-ジイル基、ペンタン-1，5-ジイル基、ヘキサン-1，6-ジイル基、ヘプタン-1，7-ジイル基、オクタン-1，8-ジイル基、2-メチルペンタン-1，3-ジイル基、2-メチルブタン-1，4-ジイル基、3-メチルブタン-1，4-ジイル基、3-メチルペンタン-1，5-ジイル基、3-エチルペンタン-1，5-ジイル基、3-メチルヘキサン-1，6-ジイル基、4-メチルヘキサン-1，6-ジイル基、4-メチルヘプタン-1，7-ジイル基などが挙げられ、好ましくはエタン-1，2-ジイル基、プロパン-1，3-ジイル基、ブタン-1，4-ジイル基である。

$R_6$ における、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基もしくはイミノ基の、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基が挙げられる。

代表的には $R_6$ は、炭素数1～3の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基、及び酸素原子が好ましく、メチレン基、及び酸素原子が特に好ましい。

$R_7$ の非限定的具体例としては、メチレン基、エタン-1，2-ジイル基、プロパン-1，3-ジイル基、ブタン-1，4-ジイル基、ペンタン-1，5-ジイ

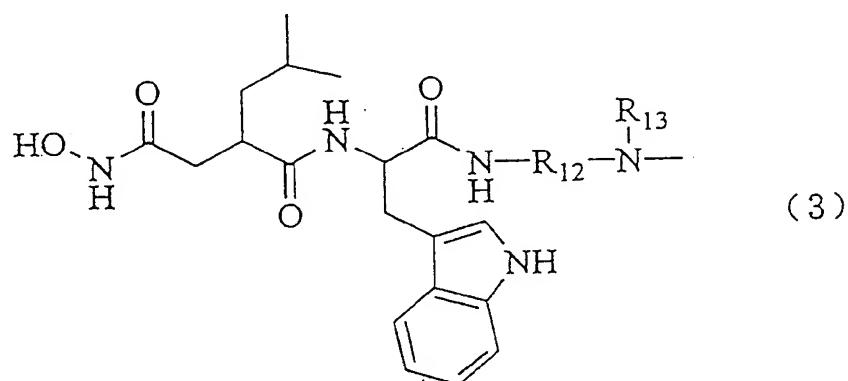
ル基、ヘキサン-1, 6-ジイル基、ヘプタン-1, 7-ジイル基、オクタン-1, 8-ジイル基、ノナン-1, 9-ジイル基、オクタン-1, 10-ジイル基、2-メチルペンタン-1, 3-ジイル基、2-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルブタン-1, 4-ジイル基、3-メチルペンタン-1, 5-ジイル基、  
 5 3-エチルペンタン-1, 5-ジイル基、3-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘキサン-1, 6-ジイル基、4-メチルヘプタン-1, 7-ジイル基、1-オキサプロパン-1, 3-ジイル基、2-オキサブタン-1, 4-ジイル基、3-オキサペンタン-1, 5-ジイル基、2-オキサヘキサン-1, 6-ジイル基、3-オキサヘキサン-1, 6-ジイル基、1, 4-ジオキサヘキサン-1, 6-ジイル基、3-オキサヘプタン-1, 7-ジイル基、2, 5-ジオキサヘプタン-1, 7-ジイル基、4-オキサオクタン-1, 8-ジイル基、2, 6-ジオキサオクタン-1, 8-ジイル基、3, 6-ジオキサノナン-1, 9-ジイル基、3, 6-ジオキサー4-メチルノナン-1, 9-ジイル基、3, 6-ジオキサー5-エチルノナン-1, 9-ジイル基、1, 4, 7-トリオキサオクタン-1, 10-ジイル基などが挙げられ、好ましくはエタン-1, 2-ジ  
 10 イル基、プロパン-1, 3-ジイル基、ブタン-1, 4-ジイル基、3, 6-ジオキサノナン-1, 9-ジイル基などが挙げられる。

R<sub>8</sub>の非限定的具体例としては、酸素原子、硫黄原子、イミノ基、メチルイミノ基、エチルイミノ基、n-プロピルイミノ基、i-プロピルイミノ基、n-ブチルイミノ基、sec-ブチルイミノ基、イソブチルイミノ基、t-ブチルイミノ基が挙げられるが、好ましくはイミノ基またはメチルイミノ基などが挙げられ、  
 20 特に好ましくはイミノ基である。

一般式(2)で示されるスペーサーの好ましい具体例としては、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-NH-、  
 25 -(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-等が挙げられる。

さらに、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）とヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩とがスペーサーを介して結合している結合体において、関節疾患治療薬（例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤）とスペーサーとの結合体の好ましい非限定的具体例としては、

5 一般式（3）：



15 [式中、 $R_{12}$ は、1個のイミノ基および／又は1～4個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数2～23の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $R_{13}$ は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]で示される結合体を挙げるができる。

一般式（3）で示される結合体のうち、ヒドロキサム酸残基部分は、一般式（1）で示される好ましいMMP阻害剤の例と同一である。

20 また、 $R_{12}$ の非限定的具体例としては、エタン-1，2-ジイル基、プロパン-1，3-ジイル基、ブタン-1，4-ジイル基、ペンタン-1，5-ジイル基、ヘキサン-1，6-ジイル基、ヘプタン-1，7-ジイル基、オクタン-1，8-ジイル基、ノナン-1，9-ジイル基、デカン-1，10-ジイル基、ウンデカン-1，11-ジイル基、ドデカン-1，12-ジイル基、2-メチルペンタン-1，3-ジイル基、2-メチルブタン-1，4-ジイル基、3-メチルブタン-1，4-ジイル基、3-メチルペンタン-1，5-ジイル基、3-エチルペンタン-1，5-ジイル基、3-メチルヘキサン-1，6-ジイル基、4-メチルヘキサン-1，6-ジイル基、4-メチルヘプタン-1，7-ジイル基、 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_3-$ 、 $-(CH_2)_4-O-$

(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-  
 などが挙げられ、好ましくはブタン-1, 4-ジイル基、ペンタン-1, 5-ジ  
 イル基、ヘキサン-1, 6-ジイル基、ヘプタン-1, 7-ジイル基、オクタン  
 -1, 8-ジイル基、ノナン-1, 9-ジイル基、デカン-1, 10-ジイル基、  
 5 ウンデカン-1, 11-ジイル基、ドデカン-1, 12-ジイル基、-(CH<sub>2</sub>)  
 2-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-O-(C  
 H<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-など  
 が挙げられる。R<sub>13</sub>の非限定的具体例としては、水素原子、メチル基、エチル基、  
 n-プロピル基、i-プロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基、イソブチ  
 10 ル基、t-ブチル基などが挙げられるが、好ましくは水素原子及びメチル基など  
 が挙げられ、特に好ましくは水素原子が挙げられる。

本発明の、一般式(2)で表されるスペーサー、及び一般式(3)で表される  
 結合体は、分子内に不斉炭素原子を有する場合があります、その絶対配置がR配置、  
 S配置である立体異性体が存在する場合があるが、その各々、あるいはそれらの  
 15 任意の割合の構造単位(スペーサー及び結合体)のいずれも本発明に包含される。

本発明の結合体の製造方法としては、例えば、関節疾患治療薬(例えば、MM  
 P阻害剤)中の活性に影響を及ぼさない部位(例えば、アミノ基、カルボキシル  
 基、水酸基、及びチオール基等が挙げられる)と、HA又はHA誘導体又はそれ  
 らの塩のカルボキシル基、水酸基、又は還元末端由来のアルデヒド基とを、化学  
 20 反応によって結合させる方法が挙げられる。これらは、既知の手法(新生化学実  
 験講座第1巻タンパク質I(東京化学同人)、蛋白質・酵素の基礎実験法(南江  
 堂)などに記載)で行うことができる。

具体的には、

(1) 脱水縮合剤を用いて、関節疾患治療薬(例えば、MMP阻害剤)あるいは  
 25 HA又はHA誘導体又はそれらの塩中のカルボキシル基を活性化し、アミド結合、  
 エステル結合またはチオエステル結合を形成させる方法；

(2) 関節疾患治療薬(例えば、MMP阻害剤)中の水酸基を臭化シアンを用い  
 て活性化した後、HA又はHA誘導体又はそれらの塩中のアミノ基と結合させる  
 方法、及びHA又はHA誘導体又はそれらの塩中の水酸基を臭化シアンを用いて

活性化した後、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中のアミノ基と結合させる方法；

（３）エピクロルヒドリン等のエピハロヒドリンもしくは１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル等のジエポキシド、あるいは、トシルクロリドやトレスルクロリド等のスルホニルクロリドを用いて、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）あるいはHA又はHA誘導体又はそれらの塩中の水酸基を活性化し、エーテル結合やイミノ結合またはスルフィド結合を形成させる方法；並びに

（４）HA又はHA誘導体又はそれらの塩中の還元末端を還元して生じた１級水酸基を酸化してアルデヒド基として、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中のアミンと還元的アルキル化を行う方法；

などが挙げられる。

また、（１）から（４）の方法を二つ以上組み合わせた方法も含まれる。

脱水縮合剤を用いて、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）あるいはHA又はHA誘導体又はそれらの塩中のカルボキシル基を活性化し、アミド結合やエステル結合またはチオエステル結合を形成させる方法の場合、一般の有機合成に用いられる縮合剤を用いることができるが、好ましくはカルボジイミド類、ホスホニウム類、ウロニウム類等を用いる。カルボジイミド類としては、ジイソプロピルカルボジイミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド等の非水溶性カルボジイミド、及び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド等の水溶性カルボジイミドがあり、ホスホニウム類としては、ベンゾトリアゾール－１－イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、７－アザベンゾトリアゾール－１－イルオキシトリス（ジメチルアミノ）ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート等があり、ウロニウム類としては、Ｏ－ベンゾトリアゾール－１－イル－N，N，N，N－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、Ｏ－７－アザベンゾトリアゾール－１－イル－N，N，N，N－テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート等がある。

また、これら縮合剤に反応促進性の添加剤を加えてもよい。添加剤として、N－ヒドロキシスクシンイミド、N－ヒドロキシー５－ノルボルネン－２，３－ジカルボキシミド、p－ニトロフェノール、ペンタフルオロフェノール、１－ヒド

ロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール等が挙げられる。

- 脱水縮合剤を用いて、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）あるいはHA又はHA誘導体又はそれらの塩中のカルボキシル基を活性化し、アミド結合やエステル結合またはチオエステル結合を形成させる方法の非限定的具体例である、
- 5 水溶性カルボジイミドによる縮合法では、0.1～1%（重量／容量）のHA水溶液にカルボジイミドを加えた後、アミノ基を有する関節疾患治療薬（MMP阻害剤）を加え、0～35℃で1～96時間反応させることができる。この間、塩酸やリン酸などの酸を添加し、反応液のpHを4～6に維持することもできる。
- 10 また、用いる関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）の、水に対する溶解性が低い場合、1～50%の有機溶媒（例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、ジオキサン、エタノール、ピリジンなど）を含む水溶液を反応溶媒とすることも可能であり、この場合、反応系に関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）を予め加え、溶けていることを確認した後、カルボジイミド
- 15 を加えてもよい。

- さらに、反応促進性の添加剤（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、N-ヒドロキシー-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシミド、p-ニトロフェノール、ペンタフルオロフェノール、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1-ヒドロキシー-7-アザベンゾトリアゾール等）とHAとを予め脱水縮合剤で処理し、
- 20 HAのカルボキシル基を活性エステルとしたものを、一旦単離した後、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）を加えて反応させることもできる。

- 関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中の水酸基を臭化シアンを用いて活性化した後、HA又はHA誘導体又はそれらの塩中のアミノ基と結合させる方法、及びHA又はHA誘導体又はそれらの塩中の水酸基を臭化シアンを用いて活性化
- 25 した後、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中のアミノ基と結合させる方法の非限定的具体例として挙げられるものを以下に記す：

HA又はHA誘導体又はそれらの塩の水溶液に、臭化シアンを加え、0～10℃で5～30分間反応させる。この間、水酸化ナトリウムやリン酸緩衝液などでpHを10～12に維持することもできる。その後、アセトニトリルを加えて沈殿

させ、過剰の臭化シアンを取り除き、再度水溶液とし、アミノ基を有する関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）を加え、4～25℃で1～24時間反応させる。この間、炭酸水素ナトリウムや水酸化ナトリウムなどで反応液のpHを8～10に維持することもできる。

- 5      HA又はHA誘導体又はそれらの塩中の還元末端を還元して生じた1級水酸基を酸化してアルデヒド基として、関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）中のアミンと還元的アルキル化を行う方法の非限定的具体例を以下に記す：

- 水素化ホウ素ナトリウムなどの還元剤で処理した後、過ヨウ素酸ナトリウムなどの酸化剤で処理することにより得られる、還元末端にアルデヒド基を有するHA又はHA誘導体又はそれらの塩の水溶液に、アミノ基を有する関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）を加え、さらに、水素化シアノホウ素ナトリウムを加え、15～30℃で1～24時間反応させる。この間、酢酸、塩酸、リン酸などの酸を加え、pHを4～6に維持することもできる。
- 10

- いずれの縮合法においても、反応後、反応液にエタノール、アセトン等の有機溶媒を加え沈殿させ、沈殿物を、アルコール沈殿、ゲルろ過、透析、イオン交換クロマトグラフィーなどの手段により精製することにより、目的とする結合体を得ることができる。
- 15

- 本発明の関節疾患治療薬とヒアルロン酸との結合体を医薬として適用する場合、本発明の結合体は、薬学的に許容できる賦形剤、又は安定剤などと一緒に製剤化してから使用することが好ましい。
- 20

- 医薬の投与形態は特に限定されず、経口投与でも非経口投与でもよく、また、全身投与でも局所投与でもよい。一般的には、本発明の医薬は非経口的に局所投与するのが好ましく、例えば、注射剤として、関節内、静脈内、筋肉内又は皮下に投与することができ、あるいはスプレー剤、局所用クリーム又は軟膏として経皮的に投与することができる。
- 25

本発明の医薬の投与量は、患者の症状、年齢、性別などに応じて適宜選択できるが、注射剤として用いる場合は一般的には、有効成分である結合体の量として0.01mg/体重kg/日～100mg/体重kg/日、好ましくは0.1mg/体重kg/日～10mg/体重kg/日である。前記1日当たりの投与量の



医薬は、一日に数回に分けて投与してもよいし、あるいは1日1回、または2日～28日に1回投与してもよい。

### 実施例

#### 5 実施例1：MMP阻害剤合成

##### (a) N-ベンジルオキシカルボニル-1, 4-ジアミノブタン

1, 4-ジアミノブタン (10 g、113 mmol) を水-エタノール (100 ml : 300 ml) に溶解し、氷冷攪拌下、ベンジルオキシカルボニルクロライド (19.35 g、113 mmol) の1, 2-ジメトキシエタン (50 ml) 溶液を約30分間で滴下した。2 N水酸化ナトリウム水溶液 2 ml を添加後、そのまま3時間氷冷攪拌し、4℃にて15時間攪拌した。大部分の溶媒を減圧で留去した後、水に溶解し、濃塩酸で酸性にした。クロロホルム (100 ml × 2) 洗浄後、水層を2 N水酸化ナトリウム水溶液にてアルカリ性にしてクロロホルムにて抽出した。得られた有機層を、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧で留去して、11.0 gの油状物を得た。(収率44%)

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  1.4–1.5 (4H, m)、2.7 (2H, t)、3.2 (2H, t)、5.1 (2H, s)、7.3–7.4 (5H, m)

MS : 222 ( $\text{M}^+$ )

#### 20 (b) N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル) アミド

氷冷攪拌下、N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニルトリプトファン (2.22 g、4.5 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (0.90 g、5.85 mmol) のN, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 (20 ml) に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) (1.12 g、5.85 mmol) を添加し、1時間攪拌した。反応液に、上記得られたN-ベンジルオキシカルボニル-1, 4-ジアミノブタン (1 g、4.5 mmol) を加え、そのまま氷冷下で攪拌後、15～30℃にて15時間攪拌を続けた。大部分の溶媒を減圧で留去した後、クロロホルム (100 ml)

に転溶し、0.5 N塩酸水溶液 (40 ml × 2)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (50 ml)、および飽和食塩水 (50 ml) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥後、濃縮して得られた残留物をクロロホルム-メタノールを溶出液としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、無色の粉末 2.

5 1 g を得た。(収率 74%)

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  2.2–3.4 (10H, m)、  
4.2 (1H, t)、4.3–4.5 (3H, m)、5.1 (2H, s)、7.  
0–8.0 (18H, m)

10 (c) L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ  
ブチル) アミド

上記 (b) で得られた縮合体 (2.1 g) を DMF (50 ml) に溶かし、ピ  
ペリジン (3 ml) を添加して 15–30 °C で 30 分間攪拌した。大部分の溶媒  
を減圧で留去した後、残留物をクロロホルム/メタノールを溶出液としたシリカ  
ゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、透明の油状物 1.0 g を得た。(収

15 率 74%)

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  1.4 (4H, m)、3.0–3.  
4 (6H, m)、3.7 (1H, m)、5.1 (2H, s)、7.0–7.7 (9  
H, m)

MS : 408 ( $\text{M}^+$ )

20 (d) (4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2-イソブチルサクシニル)-  
L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)  
アミド : (化合物 1a)

L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)  
アミド (1.18 g, 2.9 mmol) を DMF 30 ml に溶解させ、氷冷攪拌  
25 下、公知の方法 (特開平 6-145148) に基づいて合成した 4-(N-ベン  
ジルオキシアミノ)-2-イソブチルこはく酸 (732 mg, 2.6 mmol)  
と、EDC (552 mg, 2.9 mmol) を順次加え、反応温度を氷冷~水冷  
とし、3 日間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、クロロホルムにて希釈し、クロロ  
ホルム層を 0.1 N塩酸、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水にて

順次洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、ろ過残さと水層を酢酸エチルで再抽出し、酢酸エチル層とクロロホルム層を合わせて減圧濃縮した。得られた粗生成物はシリカゲルクロマトグラフィー精製（WAKO、C-200、溶出溶媒クロロホルム、及びクロロホルム：アセトン＝1：1）を行い、得られたフラクションをまとめて減圧濃縮、乾燥し、標題化合物1aを1.20g（68%）得た。

MS：670（M+H<sup>+</sup>）

(e) (4-(N-ヒドロキシアミノ)-2-(R)-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(4-N-アミノブチル)アミド：(化合物2)

10 (4-(N-ヒドロキシアミノ)-2-(S)-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(4-N-アミノブチル)アミド：(化合物3)

(4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミド  
(化合物1a) (1.20g、1.8mmol) をメタノール50mlに溶解させ、

15 水素雰囲気常圧下、10%Pd/C140mgにて16時間接触還元した。反応液をセライトろ過後、減圧濃縮した。得られた粗生成物を逆相HPLC（カラム：YMC-Pack、ODS、250mm×20mm I.D.、溶出溶媒：0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）を含む水-アセトニトリル系、流速：10ml/分）にて、ジアステレオマーをそれぞれ分取精製し、凍結乾燥を行い、標題化合物2（親水性側のピーク）のTFA塩283mgと、標題化合物3（疎水性側のピーク）のTFA塩493mgとを、それぞれ得た。

化合物2：

<sup>1</sup>H-NMR（270MHz、CD<sub>3</sub>OD）：0.70（3H、d、J=6Hz）、0.77（3H、d、J=6Hz）、1.02-1.53（7H、m）、2.12（1H、dd、J=14、5Hz）、2.29（1H、dd、J=14、9Hz）、2.59-2.68（1H、m）、2.80-2.85（2H、m）、3.10-3.36（4H、m）、4.49-4.58（1H、m）、6.96-7.09（3H、m）、7.30（1H、d、J=8Hz）、7.57（1H、d、J=8Hz）、7.95-8.04（2H、m）

MS : 446 ( $M+H^+$ )

化合物 3 :

$^1H$ -NMR (270 MHz,  $CD_3OD$ ) : 0.51 (3H, d,  $J=6$  Hz) 、  
 0.56 (3H, d,  $J=6$  Hz) 、 0.63-0.92 (2H, m) 、 1.1  
 5 1-1.21 (1H, m) 、 1.56-1.58 (4H, m) 、 2.02 (1H,  
 dd,  $J=15$ 、2 Hz) 、 2.31 (1H, dd,  $J=15$ 、11 Hz) 、 2.  
 48-2.60 (1H, m) 、 2.86-3.45 (6H, m) 、 4.64-4.  
 72 (1H, m) 、 6.91-7.04 (3H, m) 、 7.27 (1H, d,  $J$   
 10 =8 Hz) 、 7.54 (1H, d,  $J=8$  Hz) 、 7.97-8.08 (2H,  
 m)

MS : 446 ( $M+H^+$ )

(f) N-ベンジルオキシカルボニル-1, 8-ジアミノオクタン

上記 (a) における N-ベンジルオキシカルボニル-1, 4-ジアミノブタン  
 の合成と同様に、1, 4-ジアミノブタンの代わりに、1, 8-ジアミノオクタ  
 15 ンを出発原料として標題化合物を油状物 6.8 g として得た (収率 58%) 。

$^1H$ -NMR (270 MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  1.3 (8H, s) 、 1.4-1.  
 5 (4H, m) 、 2.7 (2H, t,  $J=7$  Hz) 、 3.2 (2H, m) 、 5.  
 1 (2H, s) 、 7.3-7.4 (5H, m)

MS : 278 ( $M^+$ )

20 (g) N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-  
 N-(8-N-ベンジルオキシカルボニルアミノオクチル) アミド

氷冷攪拌下、N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニルトリプトファン (7.  
 8 g、15.8 mmol) 、 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (3.15 g、  
 20.5 mmol) の DMF 溶液 (100 ml) に、EDC (3.90 g、20.  
 25 5 mmol) を添加し、1 時間攪拌した。反応液に、上記得られた N-ベンジル  
 オキシカルボニル-1, 8-ジアミノオクタン (4.4 g、15.8 mmol)  
 を加え、そのまま氷冷下で攪拌後、15~30℃にて15時間攪拌を続けた。大  
 部分の溶媒を減圧で留去した後、クロロホルム (200 ml) に転溶し、0.5  
 N 塩酸水溶液 (50 ml  $\times$  3) 、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 ml) 、

および飽和食塩水（50 ml）で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥後濃縮し、精製せずにそのまま次の反応に用いた。

(h) L-トリプトファン-N-(8-N-ベンジルオキシカルボニルアミノオクチル) アミド

- 5 上記(g)で得られた縮合体をDMF（150 ml）に溶かし、ピペリジン（10 ml）を添加して15～30℃で30分間攪拌した。大部分の溶媒を減圧で除去した後、残留物をクロロホルム/メタノールを溶出液としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、黄色の油状物6.1 gを得た。（N-ベンジルオキシカルボニル-1, 8-ジアミノオクタンからの収率74%）

- 10 <sup>1</sup>H-NMR（270 MHz、CDCl<sub>3</sub>）：δ 1.2-1.6（12 H、m）、2.9-3.4（6 H、m）、3.7（1 H、m）、5.1（2 H、s）、7.0-7.7（9 H、m）

MS：465（M<sup>+</sup>）

(i) (4-(N-ベンジルオキシアミノ)-2-イソブチルサクシニル)-

- 15 L-トリプトファン-N-(8-N-ベンジルオキシカルボニルアミノオクチル) アミド：（化合物4）

- 化合物1aの合成例と同様に、L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミドの代わりにL-トリプトファン-N-(8-N-ベンジルオキシカルボニルアミノオクチル)アミド（2.07 g、4.5 mmol）を原料として、標題化合物2.5 gを得た（収率85%）。但し、反応溶媒はDMF 30 mlとし、反応時間は2日間とした。また、減圧濃縮した反応残さは酢酸エチルにて希釈し、再抽出は行わなかった。シリカゲルクロマトグラフィー精製の溶出溶媒には、クロロホルム、及びクロロホルム：アセトン＝2：1を用いた。得られた標題化合物は、そのまま次の反応に使用した。

- 25 (j) (4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(R)-イソブチルサクシニル)-  
L-トリプトファン-N-(8-N-アミノオクチル) アミド：（化合物5）  
(4-(N-ヒドロキシアミノ)-2(S)-イソブチルサクシニル)-L-トリ  
プトファン-N-(8-N-アミノオクチル) アミド：（化合物6）

化合物2および化合物3の合成例と同様に、（4-(N-ベンジルオキシアミ

ノ) - 2 - イソブチルサクシニル) - L - トリプトファン - N - (4 - N - ベンジルオキシカルボニルアミノブチル) アミド (1) の代わりに (4 - (N - ベンジルオキシアミノ) - 2 - イソブチルサクシニル) - L - トリプトファン - N - (8 - N - ベンジルオキシカルボニルアミノオクチル) アミド (化合物 4) 2.

- 5 5 g (3.4 mmol) を原料として、標題化合物 5 および標題化合物 6 のジアステレオ混合物 (化合物 7) 1.7 g を得た (収率 100%)。このジアステレオ混合物のうち、360 mg を逆相 HPLC にて、ジアステレオマーをそれぞれ分取精製し、凍結乾燥を行い、標題化合物 5 (親水性側のピーク) の TFA 塩 151 mg と、標題化合物 6 (疎水性側のピーク) の TFA 塩 147 mg とを、  
10 それぞれ得た。

化合物 5 :

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz, DMSO- $d_6$ ) : 0.74 (3H, d,  $J=6\text{ Hz}$ ), 0.79 (3H, d,  $J=6\text{ Hz}$ ), 0.97-1.59 (15H, m), 1.91 (1H, dd,  $J=14, 8\text{ Hz}$ ), 2.03 (1H, dd,  $J=14, 7\text{ Hz}$ ), 2.62-2.83 (3H, m), 2.89-3.12 (4H, m), 4.40-4.48 (1H, m), 6.95 (1H, dd,  $J=7, 7\text{ Hz}$ ), 7.04 (1H, dd,  $J=7, 7\text{ Hz}$ ), 7.11 (1H, d,  $J=2\text{ Hz}$ ), 7.30 (1H, d,  $J=8\text{ Hz}$ ), 7.54 (1H, d,  $J=8\text{ Hz}$ ), 7.58-7.81 (4H, m), 8.01 (1H, d,  $J=8\text{ Hz}$ ), 8.73 (1  
15 H, s), 10.38 (1H, s), 10.78 (1H, s)

MS : 502 ( $M+H^+$ )

化合物 6 :

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz, DMSO- $d_6$ ) : 0.55 (3H, d,  $J=5\text{ Hz}$ ), 0.66 (3H, d,  $J=5\text{ Hz}$ ), 0.75-1.59 (15H, m), 1.94 (1H, dd,  $J=15, 5\text{ Hz}$ ), 2.14 (1H, dd,  $J=15, 9\text{ Hz}$ ), 2.57-3.38 (7H, m), 4.32-4.44 (1H, m), 6.95 (1H, dd,  $J=7, 7\text{ Hz}$ ), 7.04 (1H, dd,  $J=7, 7\text{ Hz}$ ), 7.10 (1H, brs), 7.30 (1H, d,  $J=8\text{ Hz}$ ), 7.53 (1H, d,  $J=8\text{ Hz}$ ), 7.65 (3H, brs), 7.90 (1H,  
25

t、 $J=6\text{ Hz}$ ）、8.19 (1H、d、 $J=8\text{ Hz}$ )、8.73 (1H、br s)、10.45 (1H、s)、10.78 (1H、s)

MS: 502 ( $M+H^+$ )

(k) N-ベンジルオキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミン

上記(a)におけるN-ベンジルオキシカルボニル-1, 4-ジアミノブタンの合成と同様に、1, 4-ジアミノブタンの代わりに、4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンを出発原料として標題化合物を油状物5.0 gとして得た(収率39%)。

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.6-1.7 (4H、m)、2.8 (2H、t、 $J=6.7\text{ Hz}$ )、3.3 (2H、m)、3.5-3.6 (12H、m)、5.1 (2H、s)、5.6 (1H、br s)、7.3-7.4 (5H、m)

MS: 354 ( $M^+$ )

(1) N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4, 7, 10-トリオキサ-トリデカニル)アミド

上記(b)におけるN-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミドの合成と同様に、N-ベンジルオキシカルボニル-1, 4-ジアミノブタンの代わりに、N-ベンジルオキシカルボニル-4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンを出発原料として標題化合物を油状物8.0 gとして得た(収率39%)。

<sup>1</sup>H-NMR (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.42-1.59 (2H、m)、1.64-1.75 (2H、m)、3.09-3.32 (10H、m)、3.42-3.60 (8H、m)、4.20 (1H、t、 $J=6.8\text{ Hz}$ )、4.31-4.50 (3H、m)、5.06 (2H、s)、5.24 (1H、br s)、5.70 (1H、br s)、6.08 (1H、br s)、6.99 (1H、s)、7.07-7.19 (2H、m)、7.27-7.42 (10H、m)、7.5

4-7. 58 (2H, m)、7. 66 (1H, d,  $J=7.3$  Hz)、7. 76  
(2H, d,  $J=7.6$  Hz)、8. 89 (1H, brs)

MS: 785. 6 ( $M+Na^+$ )

(m) L-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル) アミド

上記(c)におけるL-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミドの合成と同様に、N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミドの代わりに、N-9-フルオレニルメチルオキシカルボニル-L-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル)アミドを出発原料として、標題化合物を油状物4. 2gとして得た(収率78%)。

$^1H$ -NMR (270 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  1. 64-1. 77 (4H, m)、2. 95-3. 04 (1H, m)、3. 23-3. 36 (7H, m)、3. 45-3. 69 (11H, m)、5. 08 (2H, s)、5. 34 (1H, brs)、7. 05-7. 21 (3H, m)、7. 26-7. 38 (6H, m)、7. 66 (1H, d,  $J=7.6$  Hz)、8. 51 (1H, brs)

MS: 541 ( $M^+$ )

(n) (4-(N-ベンジルオキシアミノ)-(2R)-イソブチルサクシニル)-L-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル) アミド (化合物8)

化合物1aの合成例と同様に、L-トリプトファン-N-(4-N-ベンジルオキシカルボニルアミノブチル)アミドの代わりにL-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4, 7, 10-トリオキサトリデカニル)アミド(1. 30g、2. 4mmol)と、公知の方法(特開平6-145148)に基づいて合成した4-(N-ベンジルオキシアミノ)-(2R)-イソブチルこはく酸(0. 56g、2. 0mmol)を原料として、標題化合物8を1. 15g(収率72%)の無色のアモルファスとして得た。但し、反応溶媒はDMF 20mlとし、反応温度は15~30℃、反応時間は6時間とした。



また、減圧濃縮した反応残さは酢酸エチルにて希釈し、クロロホルム層を硫酸水素カリウム水溶液、水、飽和炭酸カリウム水溶液、飽和食塩水にて順次洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。シリカゲルクロマトグラフィー精製の溶出溶媒には、酢酸エチル及びジクロロメタン：メタノール＝9：1を用いた。

- 5  $^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) :  $\delta$  0.74 (3H, d,  $J=5.9$  Hz)、0.80 (3H, d,  $J=6.5$  Hz)、0.93–1.05 (1H, m)、1.29–1.41 (2H, m)、1.51–1.58 (2H, m)、1.60–1.67 (2H, m)、1.94 (1H, dd,  $J=14.0$ , 7.3 Hz)、2.08 (1H, dd,  $J=14.3$ , 7.3 Hz)、2.65–2.78 (1H, m)、2.92–3.14 (6H, m)、3.26 (2H, t,  $J=6.5$  Hz)、3.38–3.48 (12H, m)、4.47 (1H, dt,  $J=7.8$ , 6.7 Hz)、4.76 (2H, s)、5.00 (2H, s)、6.94 (1H, dd,  $J=7.6$ , 7.2 Hz)、7.04 (1H, dd,  $J=8.1$ , 7.2 Hz)、7.12 (1H, s)、7.22 (1H, t,  $J=5.7$  Hz)、7.29–7.34 (11H, m)、7.55 (1H, d,  $J=7.6$  Hz)、7.79 (1H, t,  $J=5.4$  Hz)、8.05 (1H, d,  $J=7.8$  Hz)、10.78 (1H, s)、11.01 (1H, s)
- 10
- 15

- (o) (4-(N-ヒドロキシアミノ)-(2R)-イソブチルサクシニル)-  
 -L-トリプトファン-N-(13-N-アミノ-4, 7, 10-トリオキサ-  
 20 トリデカニル)アミド(化合物9)

- (4-(N-ベンジルオキシアミノ)-(2R)-イソブチルサクシニル)-  
 L-トリプトファン-N-(13-N-ベンジルオキシカルボニルアミノ-4,  
 7, 10-トリオキサ-トリデカニル)アミド(化合物8) (1.90 g, 2.  
 4 mmol) をメタノール 200 ml に溶解させ、炭酸水素ナトリウム 200 m  
 25 g を加え、水素雰囲気常圧下、10% Pd/C 200 mg にて3時間接触還元し  
 た。反応液をセライトろ過後、減圧濃縮したところ標題化合物9が無色のアモル  
 ファスとして1.50 g (収率99%) 得られた。

$^1\text{H-NMR}$  (270 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) :  $\delta$  0.84 (3H, d,  $J=5.9$  Hz)、0.89 (3H, d,  $J=6.2$  Hz)、1.17 (1H, ddd,  $J$

- = 1.1.9、7.6、5.1 Hz)、1.38-1.54 (2H、m)、1.56-1.65 (2H、m)、1.71-1.81 (2H、m)、2.15 (1H、dd、J=14.9、7.4 Hz)、2.28 (1H、dd、J=14.3、7.4 Hz)、2.78 (1H、t、J=6.8 Hz)、2.80 (1H、brs)、  
5 3.09-3.32 (6H、m)、3.44-3.49 (2H、m)、3.52-3.65 (8H、m)、4.62 (1H、t、J=7.3 Hz)、7.04 (1H、dd、J=7.6、7.0 Hz)、7.12 (1H、dd、J=8.0、7.0 Hz)、7.15 (1H、s)、7.37 (1H、d、J=8.0 Hz)、7.65 (1H、d、J=7.6 Hz)  
10 MS : 578 (M+H<sup>+</sup>)

#### 実施例 2 : 結合体の合成例 1

- MMP 阻害剤 (化合物 2) 70 mg に、N-メチルピロリドン 0.49 ml と  
ピリジン 0.01 ml を加えて溶かし、1 M 塩酸 0.045 ml と水で pH を 4.  
15 7 に調整し、全量を 1 ml とした。これをヒアルロン酸ナトリウム 5 mg に加え、  
均一とした。再度 pH 4.7 を確認し、氷冷下、EDC 10 mg を加え 30 分間  
攪拌し、その後 15 ~ 30 °C で 15 時間攪拌した。

- 反応液に、0.1 M 重曹 1 ml とエタノール 6 ml を加え沈殿させ、沈殿物は、  
アルコール沈殿法 (沈殿を 0.2 M 食塩水 1 ml に溶かし、エタノール 3 ml で  
20 沈殿させ、沈殿を遠心分離する) を 3 回繰り返すことにより精製し、4.3 mg  
の結合体 (「結合体 1」) を得た。

- インドール環に由来する 279 nm での UV 吸収から算出された結合率は、0.  
84 重量%であった。これは、0.76% のカルボキシル基が反応したことに相  
当する。

25

#### 実施例 3 : 結合体の合成例 2

- MMP 阻害剤 (化合物 3) 70 mg に、N-メチルピロリドン 0.49 ml と  
ピリジン 0.01 ml を加えて溶かし、1 M 塩酸 0.05 ml と水で pH を 4.  
7 に調整し、全量を 1 ml とした。これをヒアルロン酸ナトリウム塩 5 mg に加

え、均一とした。再度pH4.7を確認し、氷冷下、EDC10mgを加え30分間攪拌し、さらに15～30℃で20時間攪拌した。

反応液に、0.1M重曹1mlとエタノール6mlを加え沈殿させ、沈殿物は、アルコール沈殿法（0.2M食塩水1mlに溶かし、エタノール3mlで沈殿させ、沈殿を遠心分離する）を3回繰り返すことにより精製し、3.5mgの結合体（「結合体2」）を得た。

インドール環に由来する279nmでのUV吸収から算出された結合率は、1.1重量%であった。これは、1.0%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

10

#### 実施例4：結合体の合成例3

MMP阻害剤（化合物7）77mgに、N-メチルピロリドン0.603mlとピリジン0.012mlを加えて溶かし、1M塩酸0.105mlと水でpHを4.7に調整し、全量を1.23mlとした。これをヒアルロン酸ナトリウム塩6.2mgに加え、均一とした。再度pH4.7を確認し、氷冷下、EDC24mgを加え4℃で3日間攪拌した。

15

反応液に、1MNaOH0.123mlとエタノール0.5mlを加え氷冷下30分間攪拌した後、さらにエタノール3mlを加え沈殿させ、沈殿物は、アルコール沈殿法（0.2M食塩水1mlに溶かし、エタノール3mlで沈殿させ、沈殿を遠心分離する）を3回繰り返すことにより精製し、6.0mgの結合体（「結合体3」）を得た。

20

インドール環に由来する279nmでのUV吸収から算出された結合率は、1.7重量%であった。これは、1.4%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

25

#### 実施例5：結合体の合成例4

MMP阻害剤（化合物7）189mgに、N-メチルピロリドン1.47mlとピリジン0.03mlを加えて溶かし、1M塩酸0.24mlと水でpHを4.7に調整し、全量を3mlとした。これをヒアルロン酸ナトリウム15mgに加

え、均一とした。再度pH 4.7を確認し、氷冷下、EDC 87mgを加え4℃で24時間攪拌した。

反応液に、0.1M重曹1.5mlとエタノール1.5mlを加え氷冷下30分間攪拌した後、さらにエタノール9ml加え沈殿させ、沈殿物は、アルコール  
5 沈殿法（沈殿を0.2M食塩水3mlに溶かし、エタノール9mlで沈殿させ、沈殿を遠心分離する）を3回繰り返すことにより精製し、13.9mgの結合体（「結合体4」）を得た。

インドール環に由来する279nmでのUV吸収から算出された結合率は、4.9重量%であった。これは、3.9%のカルボキシル基が反応したことに相当する。  
10

#### 実施例6：結合体の合成例5

結合体の合成例3と同じ原料や試薬を用い、同様の操作を行ったところ、5.7mgの「結合体5」を得た。

15 インドール環に由来する279nmでのUV吸収から算出された結合率は、結合体の合成例3の時と再現性よく、1.7重量%であった。これは、1.4%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

#### 実施例7：結合体の合成例6

20 MMP阻害剤（化合物9）145mgに、N-メチルピロリドン0.89mlとピリジン0.02mlを加えて溶かし、6M塩酸0.09mlと水でpHを4.7に調整し、全量を1.82mlとした。これをヒアルロン酸ナトリウム9.1mgに加え、均一とした。再度pH 4.7を確認し、氷冷下、EDC 35mgを加え4℃で24時間攪拌した。

25 反応液に、0.1M重曹0.375mlとエタノール0.375mlを加え氷冷下30分間攪拌した後、さらにエタノール5ml加え沈殿させ、沈殿物は、アルコール沈殿法（沈殿を0.2M食塩水2mlに溶かし、エタノール6mlで沈殿させ、沈殿を遠心分離する）を3回繰り返すことにより精製し、8.2mgの結合体（「結合体6」）を得た。

インドール環に由来する 279 nm での UV 吸収から算出された結合率は、1.0 重量%であった。これは、0.70%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

#### 5 実施例 8 : 結合体の合成例 7

N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシミド 8.9 mg を水に溶かし、ピリジン 0.01 ml と 1 M 塩酸 0.07 ml と水とで pH を 4.7 に調整し、全量を 1 ml とした。これをヒアルロン酸ナトリウム 5 mg に加え、均一とした。氷冷下、EDC 9.6 mg を加え 4℃ で 17 時間攪拌した。氷冷下、  
10 2%酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6) 0.5 ml を加えた後、アセトン 4 ml を加え沈殿を析出させた。沈殿を遠心分離し、減圧で乾燥した。

MMP 阻害剤 (化合物 9) の TFA 塩 (化合物 10) 86 mg [MMP 阻害剤 (化合物 9) を 0.1% TFA を含む蒸留水に懸濁し、凍結乾燥することにより得た] を、N-メチルピロリドン 0.49 ml とピリジン 0.01 ml を加えて  
15 溶かし、1 M 塩酸 0.035 ml と水で pH を 8.0 に調整し、全量を 1 ml とした。これを上述の沈殿物に加え、4℃ で 3 日間攪拌した。

反応液に、2 M 食塩水 0.2 ml とエタノール 3 ml を加え沈殿させ、沈殿物を遠心分離した。この沈殿に 0.2 M 食塩水 1 ml と 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 0.06 ml を加え、氷冷下 1 時間攪拌し可溶化させ、エタノール 3 ml で沈  
20 殿を析出させ、沈殿を遠心分離した。再度、この沈殿に 0.2 M 食塩水 1 ml と 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 0.06 ml を加え、氷冷下 3 時間攪拌し可溶化させ、エタノール 3 ml で沈殿を析出させ、沈殿を遠心分離した。引き続き、沈殿を 0.2 M 食塩水 1 ml に溶かし、エタノール 3 ml で沈殿させ、沈殿を遠心分離し、さらにこの沈殿を 90% エタノール/水で懸濁し遠心分離した後、水に溶  
25 かして凍結乾燥することで、6.0 mg の結合体 (「結合体 7」) を得た。

インドール環に由来する 279 nm での UV 吸収から算出された結合率は、1.1 重量%であった。これは、0.78%のカルボキシル基が反応したことに相当する。

### 試験例 1 : マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 阻害活性

コラゲナーゼ 1、ストロメリシン 1、ゲラチナーゼ A およびゲラチナーゼ B に対する「結合体 1」、「結合体 7」および HA の酵素阻害活性を測定した。なお、コラゲナーゼ 1 とストロメリシン 1 に対する阻害活性は、ヤガイ社製の I 型コラゲナーゼ活性測定キットとストロメリシン 1 測定キットを、また、ゲラチナーゼ A とゲラチナーゼ B に対する阻害活性は、ロッシュ・ダイアグノスティック社製のゲラチナーゼ活性測定キットをそれぞれ用いて測定した。結果は、薬物非添加時の酵素活性を 100 とした時の酵素活性の平均値として表示した (n=2)。図 1、図 2、図 8 及び図 9 に示したように、「結合体 1」及び「結合体 7」はこれら 4 種類のいずれの酵素に対しても阻害活性を有していたが、HA は阻害活性を示さなかった。

これらの実験結果から、「結合体 1」及び「結合体 7」は HA にはない、MMP 阻害活性を有していることが判明した。

### 15 試験例 2 : マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 阻害活性に及ぼすスペーサーの影響

特許第 2 7 3 6 2 8 5 号公報記載の MMP 阻害剤 (N-[2-イソブチル-3-(N'-ヒドロキシカルボニルアミド)-プロパノイル]-L-トリプトファンメチルアミド: 化合物 1) と HA 間のスペーサー長を C4 から C10 に変えた 4 種類の結合体 (結合体 1、結合体 3、結合体 4 及び結合体 6) について、ゲラチナーゼ A およびゲラチナーゼ B に対する阻害活性を比較した。結果は、薬物非添加時の酵素活性を 50% 阻害するのに必要な薬物濃度 (IC<sub>50</sub> 値) で表した (下記の表 1)。スペーサー長が大きくなるに従い、ゲラチナーゼ A に対する阻害活性が強くなる傾向が若干見られたが、これら 4 種類の結合体間で阻害活性に大きな違いは認められず、この結果から、同じ合成法 (HA と MMP 阻害剤を混合した後、縮合剤を加える方法) で調製した結合体 (結合体 1、結合体 3、結合体 4、結合体 6) の間で比較すると、阻害活性に及ぼすスペーサー長の影響は少ないものと考えられた。

また、「結合体 6」と、HA を予め活性エステルとした後、MMP 阻害剤を加

えて反応させる方法で合成した「結合体 7」とを比較すると、スペーサーは同一かつ阻害剤の結合量はほぼ同じであるにもかかわらず、ゲラチナーゼ A の阻害活性には約 10 倍の差が見られた。このことから、合成法の違いによって、結合後の MMP 阻害剤の阻害活性は、結合前の阻害活性から変化する可能性が示唆された。

表 1 :

## MMP 阻害活性に及ぼすスペーサーの影響

結合体	スペーサー	酵素阻害活性 (IC <sub>50</sub> , mg/ml)	
		ゲラチナーゼ A	ゲラチナーゼ B
結合体 1	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -NH-	1	0.03
結合体 3	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> -NH-	0.7	0.04
結合体 4	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> -NH-	0.2	0.02
結合体 6	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	0.2	NT
結合体 7	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> -NH-	0.02	0.01

## 試験例 3 : コラーゲンフィルム破壊阻害活性

Gavrilovic, Jらの方法 (Cell. Biol. Int. Reports, 9, 1097-1107(1985)) に従って行った。3～6 週齢のウサギ膝関節からコラゲナーゼ処理により回収した関節軟骨細胞を、0.2% のラクトアルブミンを含む 500 μl の Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) に浮遊させ、浮遊液 500 μl ずつを、<sup>14</sup>C でラベ

ルしたモルモット皮膚由来タイプ I 型コラーゲンフィルムでプレコートされた 4  
8 ウェル培養プレート上に播種した。「結合体 3」または HA をインターロイキン 1 (1 ng/ml) とプラスミン (100  $\mu$ g/ml) の存在下、37℃の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 72 時間培養した。培養終了後、培養上清と、残存するコラーゲンフィルムをコラゲナーゼ処理した消化液を回収し、それぞれの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。結果は下記の式に従って、破壊されたコラーゲンフィルムの破壊率 (%) の平均値として算出した (n=2)。

コラーゲンフィルム破壊率 (%) = [ (培養上清中の放射活性) / (培養上清中の放射活性 + 残存したコラーゲンフィルム中の放射活性) ] × 100

図 3 に示したように、「結合体 3」はインターロイキン 1 とプラスミンによって誘導された細胞性のコラーゲン破壊を抑制したが、HA は抑制効果を示さなかった。

この結果から、HA と MMP 阻害剤との結合体は、HA では抑制しえない関節軟骨細胞によるコラーゲン破壊に対しても優れた抑制効果を持つことが明らかとなった。

#### 試験例 4 : 結合体の結合安定性 1

「結合体 5」を 1 mg/ml の濃度で生理食塩水に溶解 (この時点での pH = 6.3 であった) し、37℃でインキュベートし、ゲルろ過クロマトグラフィーで結合体の変化を分析した。

カラムは TSK gel G4000PW (7.5 mm I.D. × 30 cm、東ソー社製)、溶出溶媒は 20% エタノールを含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6)、カラム温度は 40℃ (L-7300、日立製)、流速は 0.7 ml/分 (L-7100、日立製)、検出にはダイオードアレイ検出器 (L-7450H、日立製) を用いた。

40  $\mu$ l の溶解液をインジェクションした際の、ボイドのインドール環由来の 279 nm での吸収によるピーク面積を 0 日、2 日、5 日と追跡したところ、変



化は認められなかった（図4）。また、この5日間で、低分子量領域への新たなピークの出現はHPLC上認められなかった。

この結果から、「結合体5」のHAとMMP阻害剤との間の結合の良好な結合安定性が示された。

5

#### 試験例5：結合体の結合安定性2

化合物1、化合物1とHAの混合物および「結合体4」を、それぞれ、Millipore社製の膜孔直径25nmの半透膜（TypeHC）で区切り、等張リン酸緩衝液溶液（pH7.4）を満たした拡散セル（ドナー側：1.5ml、アクセプター側：8.0ml）に入れ、  
10 ドナー側からアクセプター側への漏出を測定波長350nmの蛍光強度から算出し、透過率として表した（図5）。ここで、透過率100%とは、薬物全量が拡散し、セル内が均一となったときの濃度を意味する。

- 1 化合物1 50nmol
- 2 化合物1 50nmolとHA 0.5mgの混合物
- 15 3 「結合体4」0.5mg（化合物150nmol相当が結合）

化合物1および化合物1とHAの混合物の場合、化合物1は速やかに膜を透過し、アクセプター側へ拡散したが、「結合体4」は8時間まで透過せず、24、48時間で2.8、3.6%が、それぞれ透過するに止まった。

この結果から「結合体4」のHAとMMP阻害剤との間の結合の良好な結合安定性が示された。  
20

#### 試験例6：関節内貯留性

9～10週齢のラット（n=4～10）の右膝関節内に以下の薬物（1～3）を投与後、経時的に動物を屠殺し、計0.5mlの生理食塩水で関節腔内を洗浄して  
25 関節液を回収した。

- 1 化合物1 30nmol
- 2 化合物1 30nmolとHA 0.3mgの混合物
- 3 「結合体4」0.3mg（化合物130nmol相当が結合）

ロッシュ・ダイアグノスティック社製のゲラチナーゼ活性測定キットを用い、

下記の式より、関節液のゲラチナーゼBに対する阻害活性を算出した。

ゲラチナーゼB阻害活性(%) = [ (関節液非存在下の酵素活性 - 関節液添加時の酵素活性) / 関節液非存在下の酵素活性 ] × 100

5

化合物1と「結合体4」のゲラチナーゼBに対する用量・阻害曲線をもとに、化合物1単独および化合物1とHAの混合物投与群では化合物1の量そのもの、「結合体4」投与群では「結合体4」に結合した化合物1相当量を薬物量として、関節液中に残存する薬物量を算出した。結果は平均値で表示した。図6に示した  
10 ように、化合物1単独および化合物1とHAの混合物投与群では、関節内に残存した薬物量は、いずれも投与2時間後には投与量(図中の0時間目の薬物量)の約1/3000に減少し、化合物1単独投与群では投与6時間、化合物1/HAの混合物投与群では投与17時間後に、それぞれ投与量の1/300000にまで減少した。これに対して「結合体4」投与群では、投与2時間後では投与量の2/5、投与17時間後  
15 でも投与量の1/10程度の薬物が残存していた。

図7には、投与直後(図の0時間目)、2時間後および17時間後に各薬物投与群より回収された関節液のゲラチナーゼB阻害活性を示した。結果は平均値±標準偏差で表示した。化合物1単独および化合物1とHAとの混合物投与群の関節液のゲラチナーゼB阻害活性は、いずれも投与2時間後には20%、投与17時間後  
20 には5%以下にまで減少していたのに対して、「結合体4」投与群では投与17時間後でも、50%程度残存していた。

これらの結果から、HAとMMP阻害剤との結合体は、関節腔内でのMMP阻害剤の貯留性を高めるための手段として、極めて優れた手段となることが明らかとなった。また、HAとMMP阻害剤との結合体は、関節腔内でも長時間に渡ってMMP阻害活性を保持し、単回の関節内投与でも長期に渡って関節破壊を阻害  
25 する可能性が示唆された。

すなわち、本発明のMMP阻害剤とHAとの結合体は、各々単独、並びにMMP阻害剤とHAとの合剤よりも、関節疾患治療薬としての効果および貯留性が優れることが示唆された。

試験例 7：関節軟骨コラーゲン破壊阻害活性

Saito, Sらの方法 (J. Biochem. 122, 49-54 (1997))に従って行った。7週例のウサギ膝関節から関節軟骨の小片 (約 10 mg) を調製し、48 ウエル培養プレート上で 500  $\mu$ l の Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 中、24 時間培養した。培養液を、500  $\mu$ l の 0.2% ラクトアルブミンを含む DMEM に交換後、「結合体 7」または HA を添加し、インターロイキン 1 (1 ng/ml) とプラスミノゲン (100  $\mu$ g/ml) の存在下、37℃の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 10 日間培養した。培養終了後、培養上清と、軟骨残査をパパイ

ン処理した消化液を回収し、最終濃度 6 N になるように塩酸を添加して、110℃のオートクレーブ中で 2 時間加水分解を行った。N<sub>2</sub> ガス噴霧によって試料を乾固後、5 mM の EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解し、マイクロプレートを用いた比色定量法によって、ヒドロキシプロリン量を測定した。結果は下記の式に従って、関節軟骨小片中から培養液中へのヒドロキシプロリン量の遊離率 (%) の平均値 ± 標準偏差で表示した (n = 4)。

$$\text{ヒドロキシプロリン遊離率 (\%)} = \left[ \frac{\text{培養上清中のヒドロキシプロリン量}}{\text{培養上清中のヒドロキシプロリン量} + \text{軟骨残査中のヒドロキシプロリン量}} \right] \times 100$$

図 10 に示したように、「結合体 7」は、1 mg/ml の濃度において、インターロイキン 1 とプラスミノゲンによって誘導された軟骨コラーゲンの破壊を有意に抑制したが、HA は有意に抑制しなかった。

この結果から、HA と MMP I との結合体は、直接の標的組織である関節軟骨の破壊に対しても、明確な抑制作用を持つことが示された。

なお、本出願が主張する優先権の基礎となる日本特許出願平成 10 年第 138 329 号、同平成 10 年第 224187 号および同平成 11 年第 43064 号の明細書に記載の内容は全て引用により本明細書中に取り込まれるものとする。

### 産業上の利用の可能性

本発明の結合体は、例えば、投与された関節腔内において、通常のHA製剤と同様に長期間貯留し、かつ、分子中のヒドロキサム酸はHA又はHA誘導体又はそれらの塩に結合した状態で局所のMMPを阻害する。そのため、既存技術では  
5 成しえなかった関節疾患治療薬（例えば、MMP阻害剤）の投与部位（例えば、膝、肩等の関節が挙げられる）での作用の限局・長期化および投与回数の低減が可能であり、従来の全身投与に比べて、関節疾患治療薬の副作用を大幅に軽減することが期待される。

また、投与部位において、HA又はHA誘導体又はそれらの塩の製剤成分と関節疾患治療薬成分の両者は、解離、分解を受けずにそれぞれの薬効を発現するので、両者の相乗的な薬効が期待できる。  
10

以上の点より、本発明の結合体は、関節疾患治療薬（例えば、ヒドロキサム酸などのMMP阻害剤）とHA又はHA誘導体又はそれらの塩の両方の薬物としての有用性が改善された薬剤、例えば、関節破壊抑制作用が強化された薬剤として、  
15 優れた変形性関節症、慢性関節リウマチ又は肩関節周囲炎の治療薬となることが期待される。

## 請求の範囲

1. (1) 1種以上の関節疾患治療薬と(2) ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩との結合体。

5 2. 結合が共有結合である、請求項1記載の結合体。

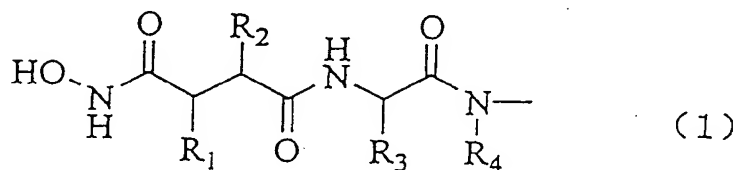
3. 関節疾患治療薬がマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤である、請求項1又は2に記載の結合体。

4. マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤がスパーサーを介してヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩と結合している請求項1から3の何れ  
10 か1項記載の結合体。

5. マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の重量割合が、結合体全体に対して0.01～50%である、請求項1から4の何れか1項記載の結合体。

6. マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤がヒドロキサム酸残基である、請求項1から5の何れか1項に記載の結合体。

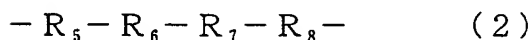
15 7. マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤が、一般式(1)：



20 [式中、 $\text{R}_1$ は、水素原子、水酸基、又は炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し； $\text{R}_2$ は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し； $\text{R}_3$ は、シクロアルキル基、アリール基もしくは複素環基で置換されていてもよい炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表し； $\text{R}_4$ は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]

25 で表されるヒドロキサム酸残基である、請求項1から6の何れか1項に記載の結合体。

8. スパーサーが、一般式(2)：

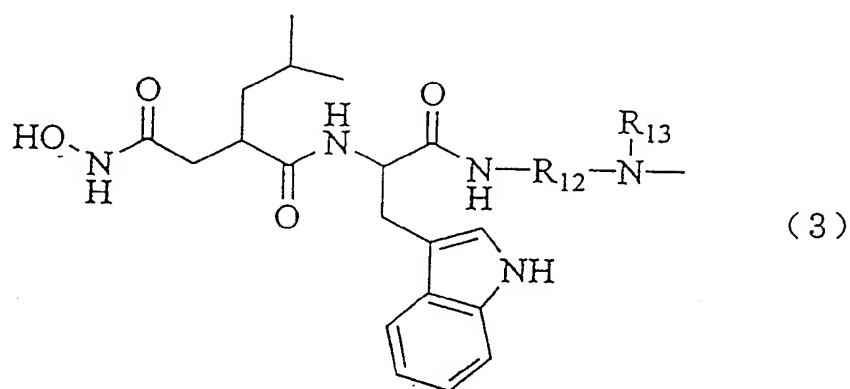


[式中、 $\text{R}_5$ は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $\text{R}_6$ は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $\text{R}_7$ は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $\text{R}_8$ は、炭素数1～8の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表す。]

6は、炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基で置換されていてもよいメチレン基もしくはイミノ基、または酸素原子を表し； $R_7$ は、1～3個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数1～10の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $R_8$ は、酸素原子、硫黄原子、又は $NR_9$ （ここで、 $R_9$ は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す）を表す。]

で表される、請求項1から7のいずれか1項に記載の結合体。

9. マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤とスペーサーとの結合体が、一般式(3)：



[式中、 $R_{12}$ は、1個のイミノ基および／又は1～4個の酸素原子が挿入されていてもよい炭素数2～23の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキレン基を表し； $R_{13}$ は、水素原子、又は炭素数1～4の直鎖もしくは分岐鎖状のアルキル基を表す。]

で表される、請求項1～8のいずれか1項に記載の結合体。

10. 生体内においてマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤がヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩と結合した状態でマトリックスメタロプロテアーゼを阻害する、請求項1から9の何れか1項に記載の結合体。

11. 関節疾患治療薬中の活性に影響を及ぼさない部位と、ヒアルロン酸又はヒアルロン酸誘導体又はそれらの塩のカルボキシル基、水酸基または還元末端の官能基とを、直接の化学反応によって又はスペーサーを介して結合させることを含む、請求項1から10の何れか1項に記載の結合体の製造方法。

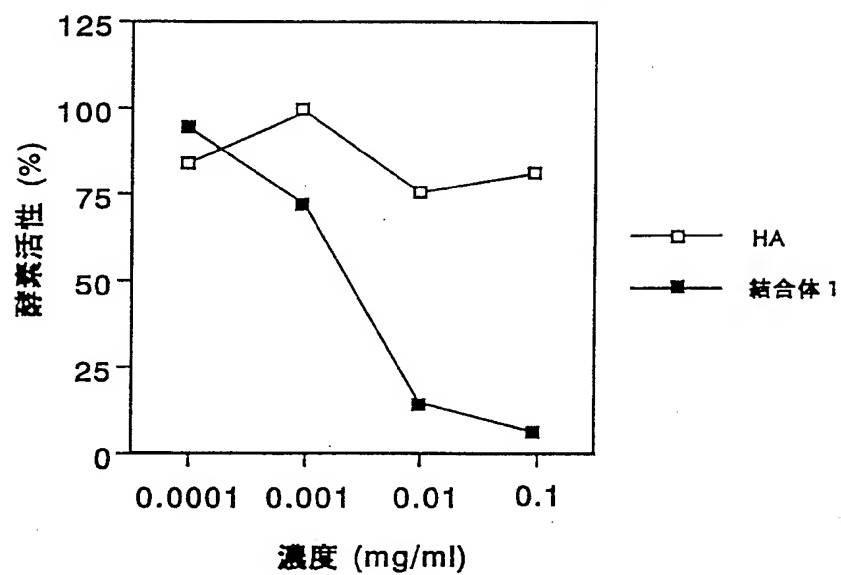
12. 請求項1か10の何れか1項に記載の結合体を含む医薬。

13. 関節疾患治療薬である、請求項12に記載の医薬。

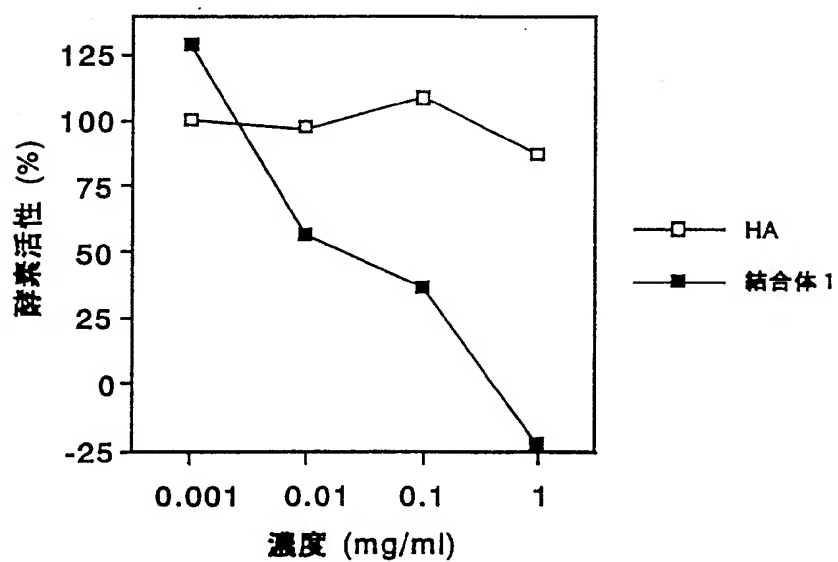
- 1 4. 関節疾患が変形性関節症、慢性関節リウマチ又は肩関節周囲炎である、請求項 1 3 に記載の医薬。
- 1 5. 請求項 1 から 1 0 の何れか 1 項に記載の結合体の、医薬を製造するための使用。
- 5 1 6. 請求項 1 から 1 0 の何れか 1 項に記載の結合体の、関節疾患治療薬を製造するための使用。
- 1 7. 関節疾患を有する患者を治療するための方法であって、薬学的に有効量の請求項 1 から 1 0 の何れか 1 項に記載の結合体を有効成分として含む医薬を該患者に投与することを含む方法。

## 図 1 : MMP 阻害活性

コラゲナーゼ 1 に対する阻害活性



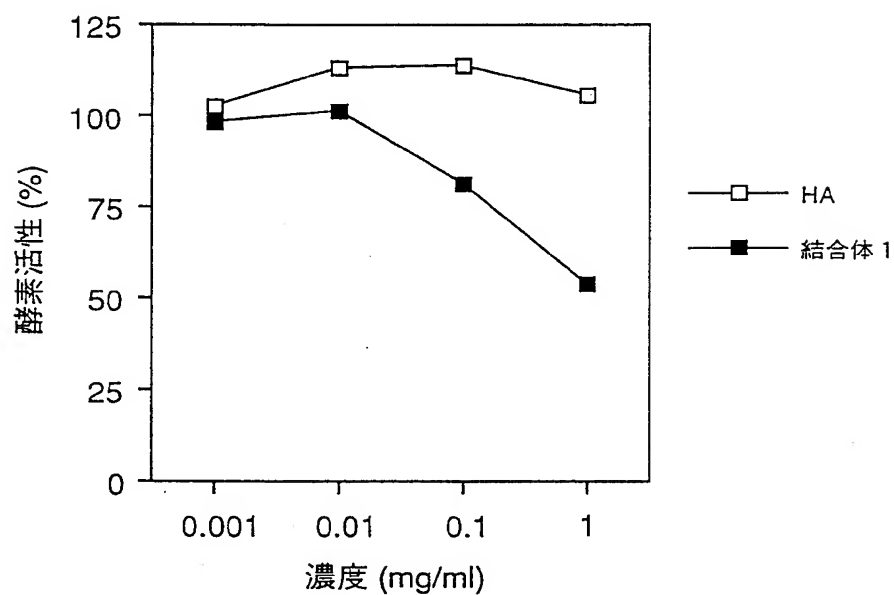
ストロメライシン 1 に対する阻害活性





## 図 2 : MMP 阻害活性

ゲラチナーゼ A に対する阻害活性



ゲラチナーゼ B に対する阻害活性

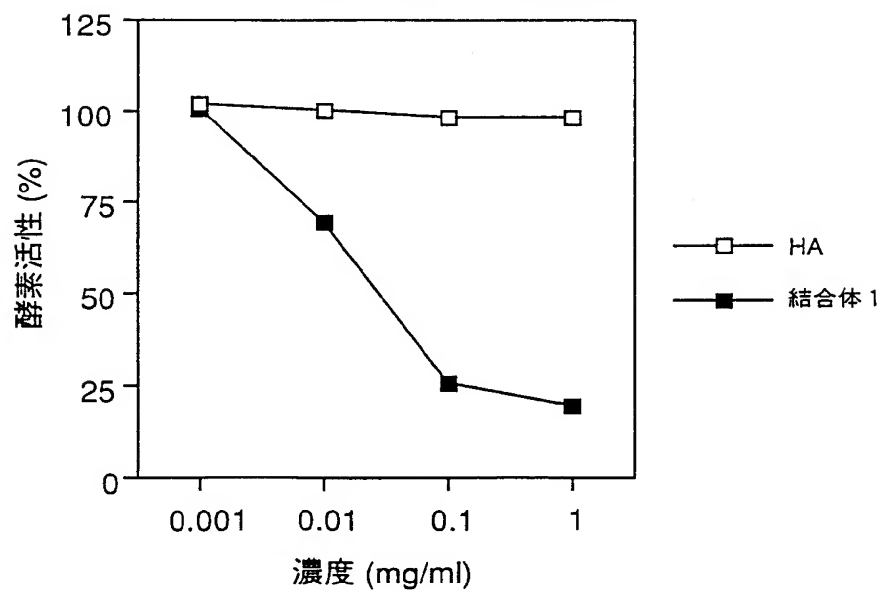


図 3 : コラーゲンフィルム破壊阻害活性

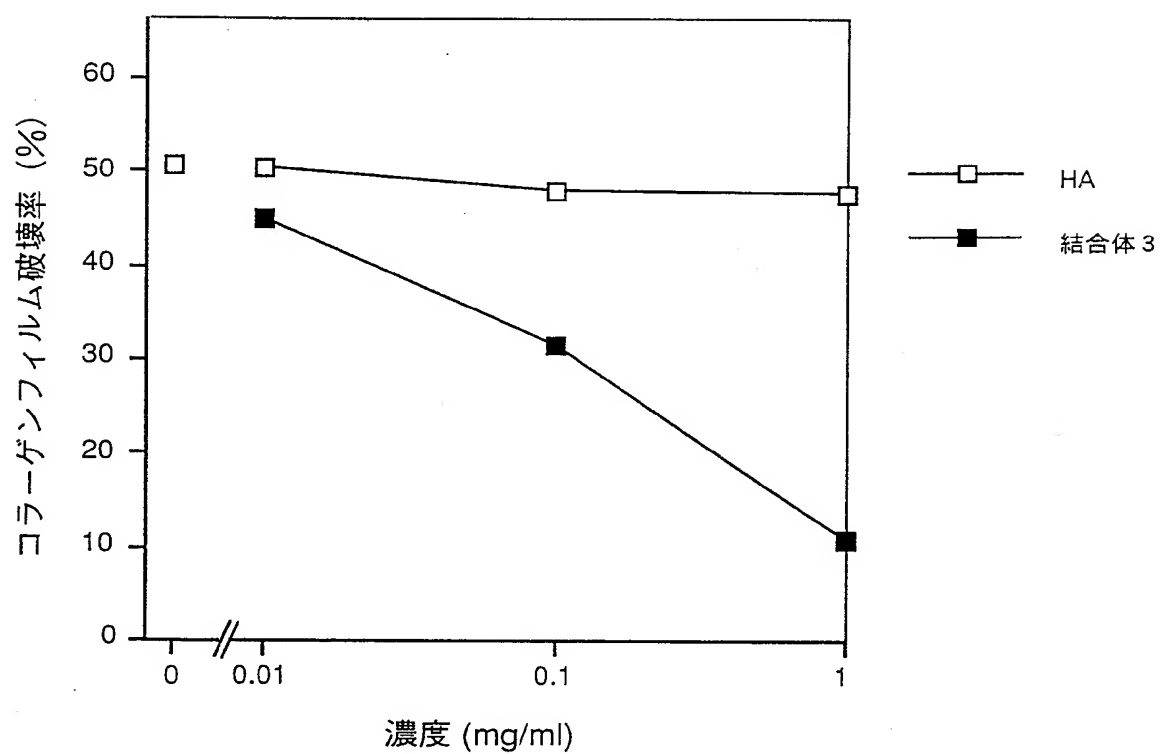


図4.「結合体5」の安定性  
(37°C 生理食塩水中)

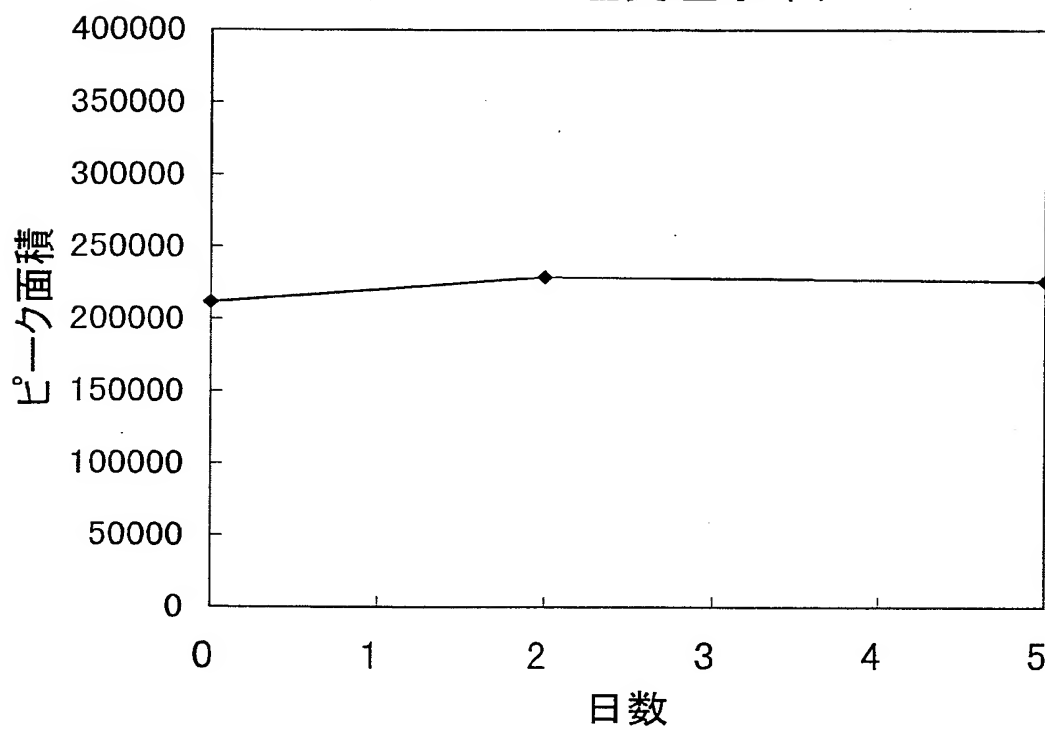


図 5 : 結合体 4 の半透膜に対する透過性

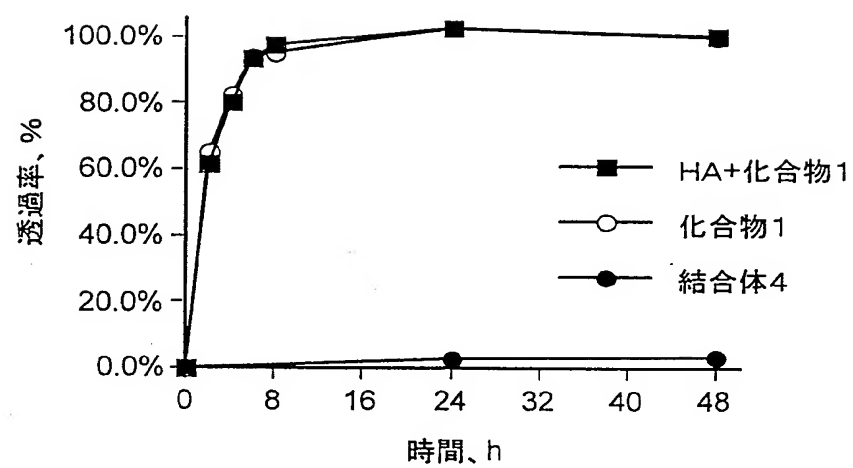


図 6 : ラット関節腔貯留性

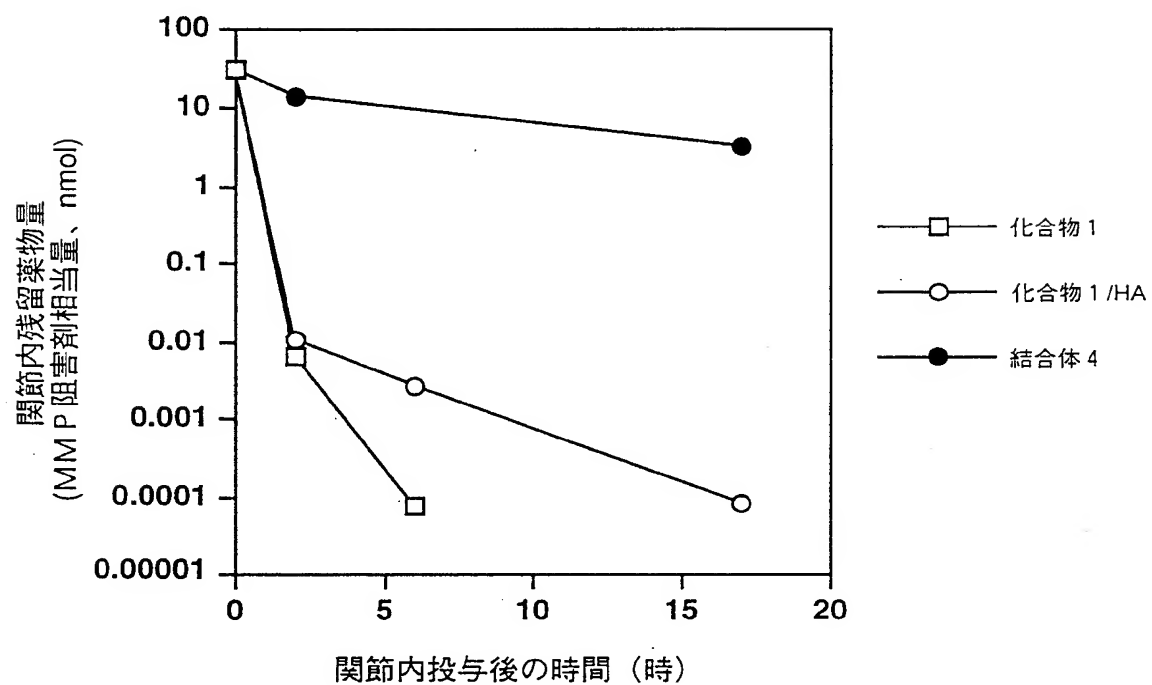
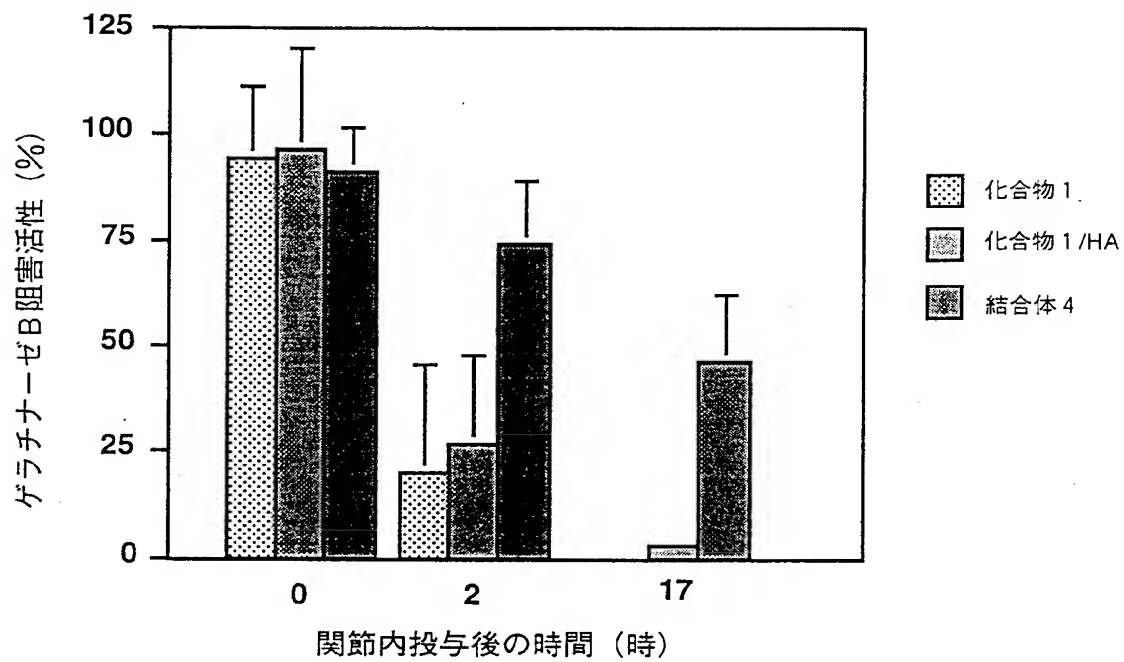
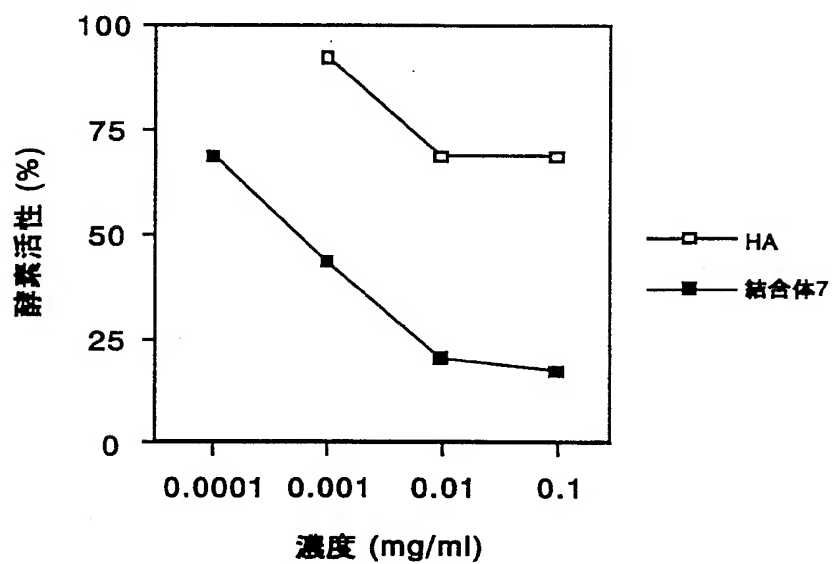


図 7 : ラット関節腔貯留性

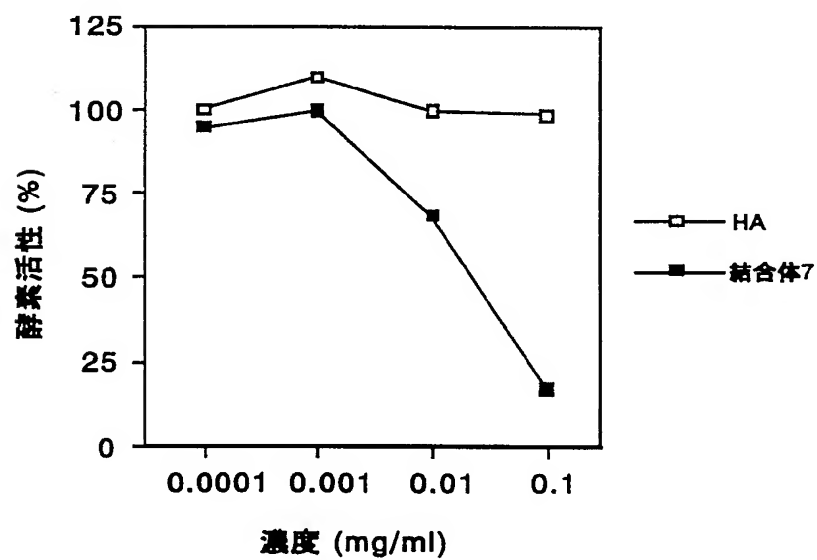


## 図 8 : MMP 阻害活性

## コラゲナーゼ-1 に対する阻害活性

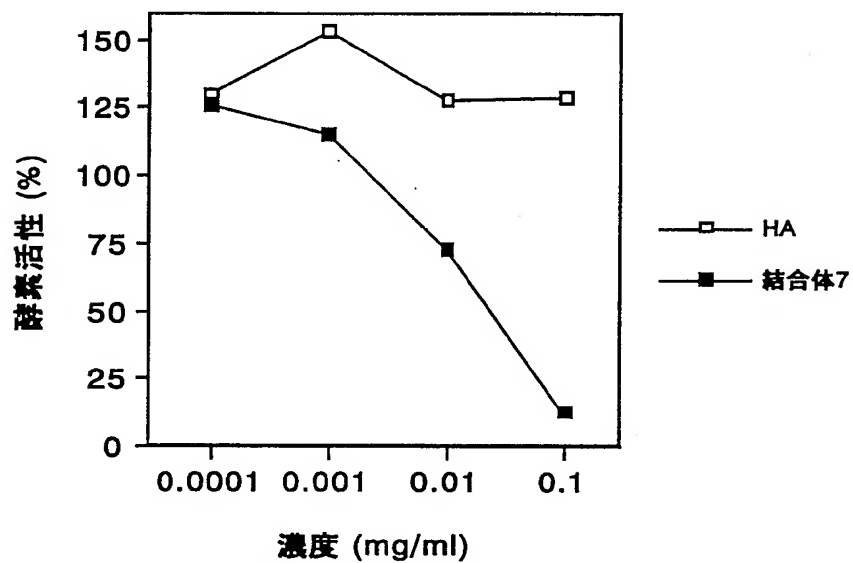


## ストロメライシン-1 に対する阻害活性



## 図 9 : MMP 阻害活性

## ゲラチナーゼ A に対する阻害活性



## ゲラチナーゼ B に対する阻害活性

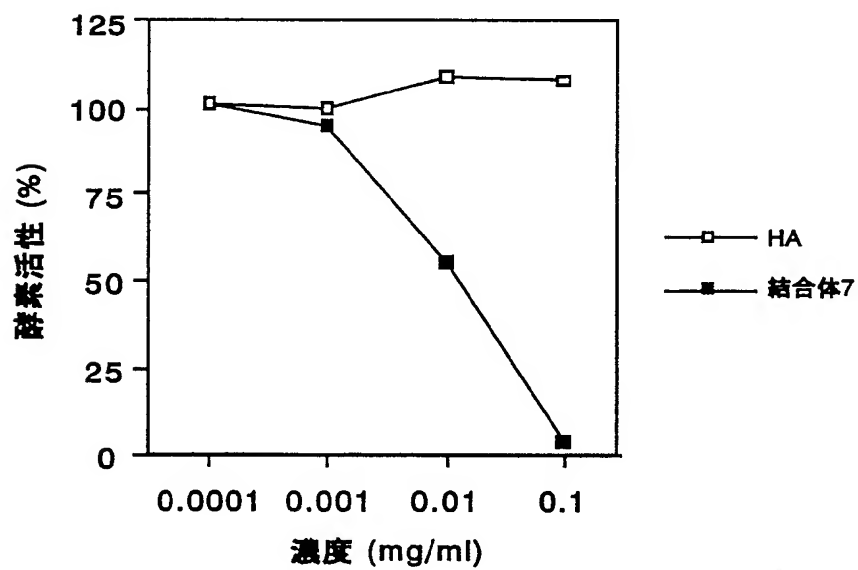
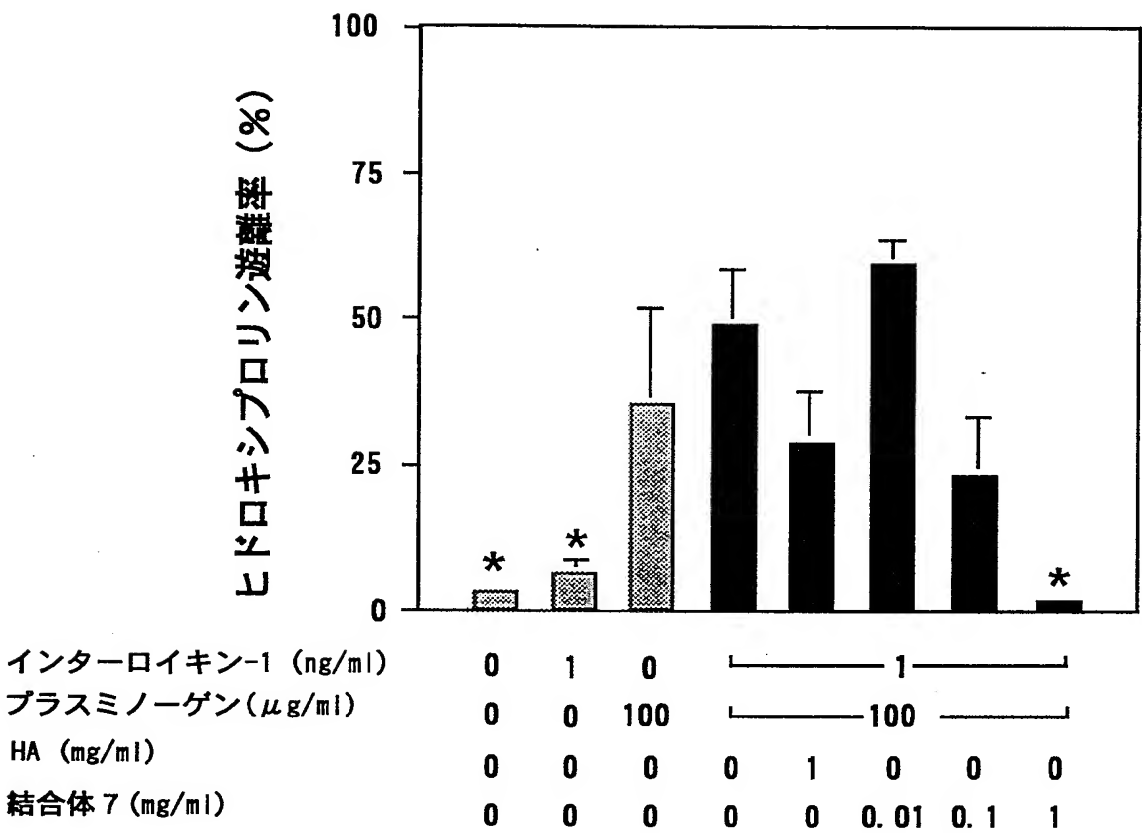




図 1 O : 関節軟骨コラーゲン破壊阻害活性



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/02600

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>5</sup> A61K31/725, C08B37/08, A61K45/00 // (A61K31/725, 31:40)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>5</sup> A61K31/725, C08B37/08, A61K45/00 // (A61K31/725, 31:40)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP, 62-64802, A (Fidia S.p.A.), 23 March, 1987 (23. 03. 87), Claims ; page 10, upper right column, line 11 to page 11, upper right column, line 20 ; page 18, upper left column, line 19 to page 20, lower left column, line 16 ; Examples 10 to 21 & EP, 216453, A & US, 4851521, A & US, 4965353, A & US, 5202431, A & US, 5336767, A	1, 2, 12-16 3-11
X Y	Vasilionkaitis, V. Search for an artificial lubricant for joints based on complexes of poly(vinyl chloride) with hyaluronic acid biopolymers, Sint. Izuch. Fiziol. Akt. Veshchestv, Tezisy Dokl. Mezhvuz Nauchn. Konf. Uchastiem Farmakol. Latv. Est. SSR, 1975, 20-1 Publisher: Vil'nyus. Gos. Univ., Vilnius, USSR. Reference as a whole & Chem. abstr., Vol. 85, 1976 (Columbus, OH, USA), the abstract No. 99131	1, 2, 12-16 3-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
--	---

Date of the actual completion of the international search 22 July, 1999 (22. 07. 99)	Date of mailing of the international search report 3 August, 1999 (03. 08. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02600

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 9-501183, A (Glycomed Inc.), 4 February, 1997 (04. 02. 97), Reference as a whole & WO, 95/199965, A1 & EP, 690841, A & US, 5773438, A & US, 5892112, A	3-11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02600

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 17 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> A61K31/725, C08B37/08, A61K45/00//  
(A61K31/725, 31:40)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> A61K31/725, C08B37/08, A61K45/00//  
(A61K31/725, 31:40)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	J P, 62-64802, A (フィデイーア・ソシエタ・ペル・ア チオニ) 23. 3月. 1987 (23. 03. 87) 特許請求の範囲、第10ページ右上欄第11行-第11ページ右上 欄第20行、第18ページ左上欄19行-第20ページ左下欄16 行、実施例10-21 &EP, 216453, A&US, 4851521, A &US, 4965353, A&US, 5202431, A &US, 5336767, A	1, 2, 12-16 3-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 07. 99

国際調査報告の発送日

03.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Vasilionkaitis, V. Search for an artificial lubricant for joints based on complexes of poly(vinyl chloride) with hyaluronic acid biopolymers, Sint. Izuch. Fiziol. Akt. Veshchestv, Tezisy Dokl. Mezhvuz Nauchn. Konf. Uchastiem Farmakol. Latv. Est. SSR, 1975, 20-1 Publisher: Vil'nyus. Gos. Univ., Vilnius, USSR. 文献全体 &Chem.abstr., Vol.85, 1976(Columbus, OH, USA), the abstract No. 99131	1, 2, 12-16 3-11
Y	J P, 9-501183, A (グリコメド・インコーポレイテッド) 04. 2月. 1997 (04. 02. 97) 文献全体 &WO, 95/199965, A1&EP, 690841, A &US, 5773438, A&US, 5892112, A	3-11

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 17 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 17 条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。